

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
8 juillet 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/057027 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002091

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2003 (04.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
PCT/FR02/04283  
11 décembre 2002 (11.12.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 PARIS  
CEDEX 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOCKEL-  
MANN, Ulrich [DE/FR]; 33, rue des Cascades, F-75020  
PARIS (FR). POUTHAS, François [FR/FR]; 18, rue  
des Gobelins, F-75013 PARIS (FR). GENTIL, Cédric  
[FR/FR]; 13, rue Francis de Pressensse, F-75014 PARIS  
(FR).

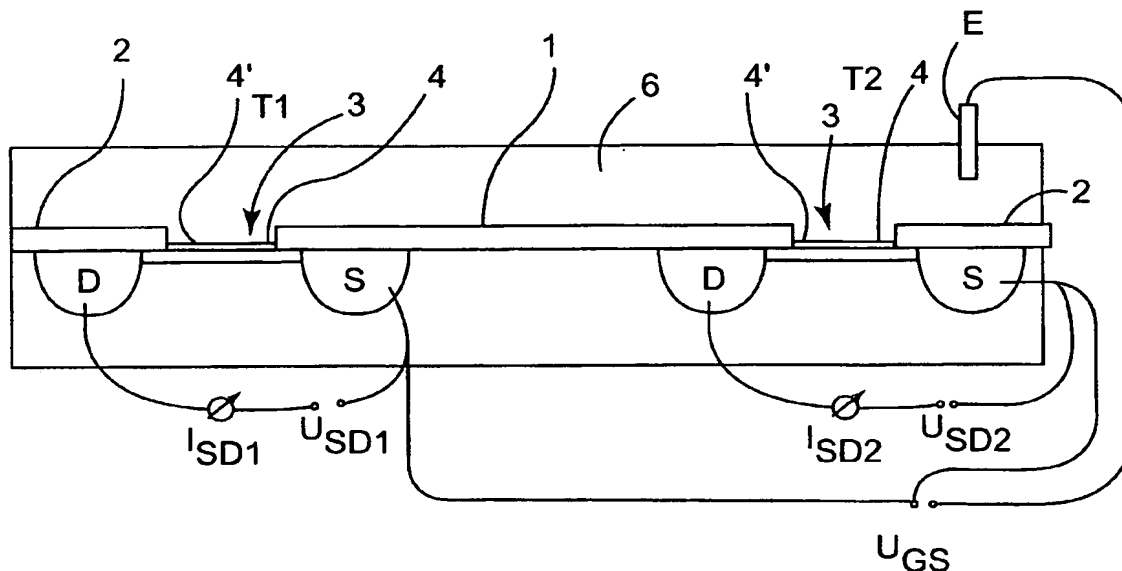
(74) Mandataires : CABINET ORES etc.; 36, rue de St Pe-  
tersbourg, F-FRANCE PARIS (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR ELECTRONICALLY DETECTING AT LEAST ONE SPECIFIC INTERACTION BETWEEN PROBE  
MOLECULES AND TARGET BIOMOLECULES

(54) Titre : PROCÉDE DE DETECTION ELECTRONIQUE D'AU MOINS UNE INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE DES  
MOLECULES SONDAS ET DES BIOMOLECULES CIBLES.



(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting at least one specific interaction between probe molecules and target biomolecules fixed to at least one active zone of a sensor. Said sensor consists of an array of field-effect transistors (T1, T2, ...), each of which has a gate region constituting an active zone (3) whereon said specific interaction is to be detected.

(57) Abrégé : Procédé de détection d'au moins une interaction spécifiques entre des molécules sondes et des biomolécules cibles fixées au moins à une zone active d'un capteur. Ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champs (T1, T2, ...) dont chacun présente une région de porte qui constitue une zone active (3) sur laquelle ladite interaction spécifique doit être détectée.



SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**PROCEDE DE DETECTION ELECTRONIQUE D'AU MOINS UNE  
INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE DES MOLECULES SONDES  
ET DES BIOMOLECULES CIBLES.**

La présente invention a pour objet un procédé de détection  
5 **électronique** d'au moins une interaction entre des molécules et des  
biomolécules cibles.

On connaît déjà un procédé de détection de l'hybridation de  
séquences d'ADN à l'aide d'un transistor à effet de champ, tel qu'il a été  
décrit dans l'article de E. SOUTEYRAND et collaborateurs intitulé « Direct  
10 Detection of the hybridization of synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by  
Field Effect » paru en 1997 dans le J. Phys. Chem. B1997, 101, pages 2980  
à 2985. Un transistor de type ISFET (« Ion-Sensitive – Field Effect  
Transistor ») utilisable dans ce type d'application a été décrit dans l'article de  
Piet BERGVELD « Development, Operation and Application of the ISFET as  
15 a Tool for Electrophysiology paru dans IEEE Transactions on Biomedical  
Engineering volume BME-19 – n° 5 Sept 1972 pages 342 à 351. Des  
indications sur la fabrication de telles structures de transistors peuvent être  
trouvées dans l'article de V. KIESSLING et collaborateurs, intitulé  
« Extracellular Resistance in Cell Adhesion Measured with a Transistor  
20 Probe » paru dans Langmuir 2000 16, pages 3517 – 3521. Enfin un mode de  
préparation des surfaces a été décrite dans l'article de A. KUMAR et  
collaborateurs, intitulé « Silanized nucleid acids : a general platform for DNA  
immobilization » paru dans Nucleid Acid Research 2000, volume 28, n° 14,  
pages i à vi.

25 Deux procédés de fixation des molécules sondes sur la  
surface sont notamment utilisables dans le cadre de la présente invention. Le  
premier consiste en une synthèse directe sur solide, telle que décrite par  
exemple dans l'article de S.P.A. Fodor et Collaborateurs intitulé « Light-  
directed, spatially adressable parallel chemical synthesis » paru dans Science  
30 251, pages 767 à 773 (1991). Le deuxième est la fixation des molécules à  
partir d'une dilution.

Pour obtenir une bonne détection des interactions entre des  
biomolécules, il convient de prendre en compte un certain nombre de  
paramètres :

### A- Sensibilité

Elle peut être très bonne (comparable à celle d'une détection par fluorescence) mais elle dépend de l'état des couches moléculaires sur les surfaces actives. Pour les capteurs du type transistor qui sont utilisés ici, la  
5 quantité nécessaire de molécules biologiques (sondes et cibles) est inversement proportionnelle à la surface du capteur. On a donc intérêt à miniaturiser les structures, mais il faut veiller au rapport signal/bruit.

### B- Dynamique

L'intervalle des différentes concentrations de molécule qu'on  
10 peut mesurer est étroit. A faible concentration, on peut être limité par des signaux parasites, (p.ex. on peut voir parfois déjà un signal induit par une goutte d'eau pure qui avait séché sur la surface). A forte concentration, on observe une saturation lorsque la charge effective s'approche de zéro.

### C- Spécificité

15 Par spécificité, on entend la capacité du système de distinguer entre deux types de molécules cibles différentes. Pour l'hybridation entre des molécules d'ADN par exemple, cette différence peut être une différence dans la séquence des paires de bases. Il s'agit d'optimiser les conditions (sel, température, durée, et éventuellement pH) de la réaction de  
20 reconnaissance intermoléculaire de façon à ce que l'interaction spécifique (p.ex. l'hybridation entre des séquences complémentaires) domine par rapport à des processus non-spécifiques (p.ex. l'adsorption, les interactions ioniques et hydrophobes non spécifiques). Ces conditions optimisées ne correspondent en général pas aux meilleures conditions pour une détection  
25 électronique. Par exemple, on utilise typiquement plus de sel pour une hybridation spécifique que pour une détection électronique. Un compromis est à trouver aussi pour la distance des molécules sondes par rapport à la surface. Une faible distance est favorable pour la détection électronique à cause de l'écrantage électrostatique mais souvent défavorable pour la  
30 spécificité. Si les molécules sondes sont trop proches de la surface en SiO<sub>2</sub>, les interactions non spécifiques molécule/surface peuvent devenir dominantes. De plus, l'interaction spécifique entre les bio molécules sondes et cibles peut être gênée par une surface à proximité (problème d'accessibilité ou empêchement stérique).

Ces effets dépendent des couches moléculaires déposées sur la surface active du réseaux de transistor (et en particulier de leur état de charge).

5 Dans la description ci-après, on a proposé une approche expérimentale permettant d'aboutir au résultat recherché. Cette approche a permis de mettre en évidence un point clé de la détection, qui constitue, l'idée de base de la présente invention, à savoir qu'il convenait de séparer la réaction de reconnaissance de l'étape de détection.

10 La présente invention concerne ainsi un procédé de détection électronique d'au moins une interaction spécifique entre des molécules sondes fixées au moins à une zone active d'un capteur et des biomolécules cibles, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champs ( $T_1$ ,  $T_2$ , ...) dont chacun présente une région de source (5), une région de drain (D) ainsi qu'une région de porte qui constitue  
15 une zone active (3) sur laquelle ladite interaction spécifique doit être détectée, et caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) mettre en contact au moins une dite zone active (3) avec des molécules sondes d'un type donné fixés sur ladite zone active.

20 b) mettre en contact au moins certaines des molécules sondes avec des biomolécules cibles susceptibles d'interaction avec lesdites molécules sondes et effectuer une dite interaction dans un tampon réactionnel ayant une première concentration en sel.

c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins un transistor  
25 dudit réseau pour détecter ladite interaction spécifique au moins un point de mesure obtenu dans un tampon de mesure ayant une deuxième concentration en sel qui est inférieure à la première concentration pour des molécules sondes ayant été soumises à ladite interaction spécifique. L'étape c peut être réalisée de manière différentielle entre ledit point de mesure et un  
30 point de référence, notamment dans un dit tampon de mesure, pour des molécules sondes du même type n'ayant pas été soumises à ladite interaction spécifique.

D'une manière générale, on considère comme molécule sonde toute molécule, notamment les biomolécules (ADN, ARN, protéines, etc...), ou bien l'ADN oligonucléotide synthétisé chimiquement, ou bien encore les acides peptides nucléiques ("PNA"), qui peut être greffée sur une dite surface active et qui peut être reconnue spécifiquement par une biomolécule cible.

Selon une variante dite temporelle, la mesure différentielle de l'étape c) est réalisée sur les mêmes molécules sondes, avant l'interaction de l'étape b).

Selon une première variante dite spatiale, la mesure différentielle de l'étape c) est effectuée entre deux groupes de molécules sondes du même type par exemple (ADN), ayant ou non les mêmes séquences, fixées sur des zones actives distinctes, l'un des groupes ayant été soumis à l'interaction de l'étape b), et l'autre pas.

Selon une deuxième variante dite spatiale, la mesure différentielle de l'étape c) est réalisée avec le tampon de mesure sur deux groupes de molécules sondes disposés sur des zones actives distinctes, ces deux groupes de molécules sondes, par exemple du même type, mais ayant ou non les mêmes séquences, et ayant été soumis à des interactions spécifiques différentes.

Les molécules sondes et/ou les biomolécules cibles sont par exemple des molécules d'ADN, d'ARN, de "PNA", de protéines, ou bien encore des petites molécules telles que les vitamines. Le tampon réactionnel et le tampon de mesure sont par exemple du KCl. La concentration en sel du tampon de mesure est par exemple supérieure à 0,002 mM et inférieure à 20 mM, et elle est par exemple supérieure à 0,005 mM et inférieure à 20 mM, et notamment comprise entre 0,005 mM et 15 mM, ou bien encore entre 0,01 mM et 15 mM. La concentration du rampon réactionnel est par exemple comprise entre 20 mM et 1 M (concentration molaire).

Le procédé selon l'invention est compatible avec une détection classique d'interaction moléculaire par fluorescence.

Le procédé peut être caractérisé en ce que ladite mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée ( $U_{DS}$ ) entre le drain et la source d'au moins un transistor, ainsi que l'application dans un premier cas d'une tension donnée ( $U_{GS}$ ) entre la porte et

la source dudit transistor ou, dans un deuxième cas d'un courant de drain ( $I_D$ ) donné audit transistor. Dans le premier cas, la mesure du point caractéristique consiste en la mesure du courant de drain  $I_D$ . Dans le deuxième cas, on mesure la tension  $U_{GS}$ .

5                    Selon une variante, on réalise une circulation à travers au moins un microcanal fluide d'au moins une solution qui constitue une référence ou qui contient des molécules cibles pour la mettre en contact avec au moins une zone active d'un transistor à effet de champ.

10                    On peut par exemple mettre une solution de référence (par exemple tampon de sel) et une solution contenant des molécules cibles successivement en contact avec une ou plusieurs zones actives, ou bien (en parallèle) avec une ou plusieurs zones actives différentes. On peut par exemple mettre en contact deux solutions de molécules cibles avec une ou plusieurs zones actives différentes en parallèle.

15                    D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description ci-après, en liaison avec les dessins annexés dans lesquels :

20                    - la figure 1 représente deux transistors à effet de champ d'une puce de détection comprenant une pluralité de tels transistors organisés suivant un réseau mono ou bidimensionnel de transistors ;

                     - la figure 2 représente en vue de dessus un détail d'une puce de détection et l'agencement des zones actives correspondant chacune à un transistor à effet de champ ;

25                    - la figure 3 illustre les connexions électriques de drain des transmissions du réseau mono ou bidimensionnel.

                     - la figure 4 représente un dispositif de dépose de la solution sur des zones actives sélectionnées ;

                     - les figures 5a à 5c représentent les résultats d'expériences réalisées dans différentes conditions expérimentales ;

30                    - les figures 6a et 6b montrent une détection électronique d'ADN ;

                     - les figures 7a et 7b illustrent la mise en œuvre de canaux microfluidiques ,

35                    - et les figures 8a à 8h et 9a à 9d illustrent deux exemples de mise en œuvre de l'invention.

Les figures 1 à 3 illustrent un capteur présentant un réseau de transistors à effet de champ FET sur un substrat en silicium. Un transistor  $T_1$  ou  $T_2$  représenté en coupe à la figure 1 est pourvu d'une région de source S et d'une région de drain D qui présentent chacune un contact électrique et qui sont surmontées d'une couche isolante respectivement 1 et 2, par exemple un oxyde thermique de  $\text{SiO}_2$ . La région active 3 entre la source S et le drain D forme la région de porte G du transistor et présente une couche isolante 4 d'épaisseur réduite, par exemple une couche de  $\text{SiO}_2$  thermique. Il est également possible de ne pas disposer d'oxyde sur cette région active. La surface active est alors délimitée par une portion 4' du substrat qui est mise à nu.

Des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN simple brin, sont fixées par un procédé connu sur au moins certaines des surfaces actives 4 ou 4'. Pour l'ADN, on utilise de préférence des transistors à effet de champ à canal n à appauvrissement (pour lesquels les porteurs de charge sont les électrons, plus mobiles d'où une augmentation de la sensibilité) avec une polarisation de porte négative (c'est-à-dire que l'électrolyte est polarisé négativement par rapport au semi-conducteur), l'ADN se chargeant négativement (pour un électrolyte de pH neutre).

L'application d'une tension source-drain  $U_{SD}$  entre la source S et le drain D ( $U_{SD1}$  pour  $T_1$ , et  $U_{SD2}$  pour  $T_2$ ) et d'une tension porte-source  $U_{GS}$  entre l'électrolyte 6 et la source S (par exemple par une électrode E unique  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) induit un gaz bidimensionnel de porteurs de charges à l'interface  $\text{Si}/\text{SiO}_2$ , ou à l'interface  $\text{Si}/\text{électrolyte}$  de chaque transistor. Il en résulte un courant de drain  $I_D$  qui, pour chaque transistor, dépend de façon sensible de la charge à l'interface  $\text{SiO}_2/\text{électrolyte}$  ou  $\text{Si}/\text{électrolyte}$ . On appelle surface active cette interface qui fait face au canal entre la source S et le drain D.

Le courant  $I_D$  dépend de la fixation des molécules sondes, par exemple des molécules d'ADN sur la surface active 4 ou 4'.

On peut réaliser une détection à tension source-porte  $U_{SG}$  et à tension source-drain  $U_{SD}$  constants, en mesurant le courant de drain  $I_{SD}$  ou bien encore, comme dans les exemples 1 et 2 ci-après, à courant de drain  $I_{SD}$  et à tension source-drain  $U_{SD}$  constants, en mesurant la tension source-porte  $U_{SG}$ .

Comme le montrent les figures 2 et 3, n structures de type transistor à effet de champ sont intégrées dans un substrat de silicium



recouvert d'un isolant ( $\text{SiO}_2$  ou autre) et pourvu de connexions appropriées (métallisation ou de préférence régions conductrices dopées) par les prises de contact électrique de source 10 et de drain ( $D_1, \dots D_n$ ). A la différence d'une structure de transistor MOS standard, il n'y a pas d'électrode métallique de porte. Ceci correspond à la structure de type « ISFET » (« Ion Sensitive Field Effect Transistor »). On utilise de préférence un substrat de type SOI (silicium sur isolant) qui procure une sensibilité plus élevée.

Les différentes structures sont à faible distance latérale l'une de l'autre et leurs surfaces actives sont en contact avec la même solution de mesure. Une dimension latérale typique dans la micro-électronique actuelle est inférieure au  $\mu\text{m}$ . Dans la technologie des puces à ADN telle que mise en œuvre dans la présente invention, la dimension latérale est de 5-10  $\mu\text{m}$  pour une synthèse directe sur le solide et de 50-100  $\mu\text{m}$  dans le cas d'une fixation des molécules à partir d'une dilution.

Dans la présente configuration de mesure parallèle, plusieurs plots avec différents types de molécules sondes immobilisées sont en contact avec la même solution notamment de mesure et au moins une structure de transistor se situe en dessous de chaque plot. La mise en œuvre de plusieurs transistors par plot est possible au vu des dimensions mentionnées ci-dessus et permet une redondance dans la détection.

Une électrode E ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ , par exemple), est utilisée pour fixer le potentiel de la solution de mesure 6 (électrolyte) par rapport à la structure en silicium qu'elle recouvre et pour fixer le point de travail des capteurs (transistors). Le potentiel de l'électrolyte 6 peut dans certains cas être égal à zéro. La solution de mesure 6 qui baigne les capteurs contient des ions à une concentration qui donne une conductivité suffisante et qui ne donne pas lieu à un écrantage trop important au niveau des surfaces actives. Son pH est de préférence neutre.

La technique proposée permet de faciliter la détection à l'aide de différentes approches

#### A- Caractériser les couches par mesures électroniques

La mesure électronique permet une caractérisation grossière des états (électrostatiques) des couches moléculaires déposées sur les transistors. On effectue des mesures électroniques entre les différentes étapes de préparation de surface. Chaque étape de traitement chimique ou de dépôt de molécule induit un décalage de la tension mesurée et les

différences entre transistors reflètent une inhomogénéité éventuelle. L'ensemble de ces décalages donne alors une caractérisation du système avec de multiples couches déposées.

En d'autres termes, on peut ainsi vérifier l'état  
5 "électrochimique" du réseau de capteurs. On peut comparer à des valeurs de références mesurées pour des conditions qu'on avait auparavant optimisé et on peut surveiller le vieillissement des structures (par exemple la dégradation des réseaux par dépôts de charges et autres effets sur l'oxyde  $\text{SiO}_2$ ). De plus, la comparaison de deux mesures électroniques séparés par un petit intervalle  
10 de temps (et éventuellement un rinçage intermédiaire) permet de vérifier l'absence de dérive importante dans le signal électronique. Ces points sont importants car la réponse des transistors à effet de champ FET à l'immobilisation de molécules sur la surface active dépend de l'ensemble des couches sur la surface active. La procédure aide à obtenir de façon  
15 reproductible une sensibilité adaptée (à la quantité de molécules qu'on souhaite détecter) et une spécificité suffisante.

Une fois que le réseau de capteur est connu, les mesures peuvent être répétées sans procéder à de nouvelles vérifications.

B- Séparer la réaction de reconnaissance de l'étape de  
20 détection.

Le dépôt des sondes, la réaction de reconnaissance et la mesure électronique peuvent être effectués dans différents tampons. Ceci permet d'optimiser ces étapes de façon largement indépendante. On montre notamment ci-après l'exemple d'une hybridation avec une concentration en  
25 sel de 50mM couplée à une détection électronique avec une concentration en sel de 0,01 mM.

#### C- Mesure différentielle

L'approche différentielle, sujet de la demande PCT/FR02/04283 dont la présente demande revendique la priorité, est un  
30 élément très important ici. Par rapport à la caractérisation des couches par mesure électronique, elle permet de détecter des inhomogénéités. Par rapport à la séparation de la réaction de reconnaissance de l'étape de détection, elle semble être même indispensable, car le décalage de la valeur de la tension  $U_{GS}$  induit par un changement de tampon montre souvent une  
35 variation plus importante que le signal correspondant à l'interaction spécifique qu'on souhaite détecter.

#### D- Structures actives

L'utilisation des structures à effet de champ FET permet une taille caractéristique de l'ordre de 1 micron. L'approche par mesure en courant alternatif AC est utilisée par Fritz et al. (Proceedings Nat. Acad. Sci., USA, Vol. 99, p. 14142 (2002)). L'approche alternative d'une structure passive  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  sans drain ni source (dite "spectroscopie d'impédance") nécessite une surface d'environ 50 microns par 50 microns en raison de la capacité parasite due aux connexions [(voir WIEGAND et al. Review of Scientific Instruments n° 71, 2309 (2000)]. On pourrait contourner cette difficulté par un traitement du signal alternatif dans la puce même, à proximité du capteur.

Mais même dans ce cas, l'électronique de mesure serait plus compliqué que celle mise en œuvre dans le cadre de la présente invention pour la mesure en courant continu DC basée sur les transistors à effet de champ FET. Les structures actives (FET) sont donc plus adaptées à une miniaturisation. En mettant en œuvre des surfaces actives de 2 microns par 20 microns, on n'est pas limité par le bruit des transistors FET.

Le procédé de détection des reconnaissances moléculaires peut être basée sur une approche par comparaison, notamment différentielle. La mesure est par exemple réalisée en utilisant plusieurs structures de transistor. La mesure peut être différentielle par rapport aux différents types de molécules greffées et inclure éventuellement plusieurs transistors par type de molécule. Il permet de comparer des signaux avant/après la réaction d'interaction qui révèle la reconnaissance moléculaire (et/ou l'évolution pendant cette réaction). On notera que la mesure de référence peut être réalisée dans le tampon de mesure ayant la deuxième concentration, mais également dans un autre tampon, par exemple dans ledit tampon réactionnel ayant une première concentration en sel.

Le procédé selon l'invention permet de contourner les difficultés associées à la sensibilité d'un capteur individuel au pH et à la force ionique et celles associées à une variabilité d'un transistor individuel à l'autre (ceci inclut la structure de transistor et la qualité de la fixation des sondes).

Un procédé selon un mode de réalisation met en œuvre les étapes suivantes :

a) traitements homogènes de toute la surface isolante pour préparer la fixation des molécules sondes ;

b) greffage local de différents types de molécules sondes sur au moins certaines des surfaces actives individuelles ;

c) éventuellement rinçages homogènes ;

5 d) mesure électronique : ajouter l'électrolyte de mesure, plonger l'électrode et mesurer les transistors (par exemple un ou plusieurs points de la caractéristique  $I_D$  en fonction de  $U_{SD}$  et de  $U_{SG}$ ), et comparer les résultats obtenus selon les transistors ;

e) éventuellement rinçages homogènes ;

10 f) ajout de la solution de molécules cibles en présence d'électrolyte et réaction de reconnaissance ;

g) éventuellement rinçages homogènes ;

h) mesure électronique, comme (d).

Certains transistors qui n'ont pas été mis en présence de molécules sondes (ou bien un seul transistor) peuvent servir de témoin. On  
15 mesure leurs caractéristiques après ajout de l'électrolyte de mesure qui par exemple, baigne l'ensemble des transistors.

Le greffage des molécules sondes est réalisé par dépôt de micro-gouttelettes de diamètre environ  $100\ \mu$  sur les surfaces actives des transistors à l'aide de micro-plumes métalliques qui sont disponibles  
20 commercialement, ou bien un système de microdéposition commercial (par exemple Nanoplotter NP1 de la Société Ge Sim).

Comme le montre la figure 3, le réseau de  $n$  transistors (par exemple  $n = 96$  transistors) présente  $n$  connexions de drain  $D_1, D_2 \dots D_n$  et 2 connexions (non représentées) équivalentes à la source commune. Les  
25 résistances série  $R_c$  associées à ces connexions ont des valeurs qui dépendent de l'index  $1 \dots n$  du drain.

Les valeurs de ces résistances  $R_c$ , réalisées par exemple par dopage du silicium, ne sont pas négligeables, mais elles peuvent être corrigées.

30 A cet effet les résistances  $R_c$  de connexion de drain sont par exemple calculées à partir des longueurs et des sections géométriques des lignes dopées dont on connaît la résistivité. Le calcul est comparé à une mesure de la résistance en fonction de l'index du drain en appliquant une tension continue (par exemple  $U_{SD} = 0,1V$  et  $U_{SG} = 2V$ ).

35 Une installation telle que celle représentée à la figure 4 peut être utilisée pour la mise en œuvre du procédé : sur une table 10, est

disposée une platine 12 incorporant un dispositif de commande à micro-contrôleur pour une table 11 assurant un déplacement selon trois directions perpendiculaires X, Y, Z. Une puce 15 incorporant le réseau de n transistors est disposée sur un support 14. Une autre platine 20 comportant une table 21  
5 assurant un déplacement selon les trois directions X, Y, et Z est mise en œuvre pour déplacer un bras 22 portant une micro-plume ou une pipette 23 pour assurer le dépôt des micro-gouttelettes sur au moins certains des n transistors. Un objectif 17 et/ou une caméra couplée à un écran 19 permettent d'observer le dépôt des micro-gouttelettes et de contrôler les  
10 opérations.

On effectue des mesures de courant de drain  $I_D$  avec par exemple  $U_{SG} = 1V$  et  $U_{SD} = 0,9V$  et un électrolyte de pH neutre déposé qui est constitué de KCl à une teneur de 0,1 millimole par litre. Les transistors (canal p à accumulation) ayant leurs sources interconnectées, la tension de source  
15 ou la tension de porte peut servir de référence de tension (par exemple la tension de masse).

Avant ces mesures, on effectue un traitement global de la surface de la structure Si/SiO<sub>2</sub> par incubation 1-2 minutes dans de l'acide sulfochromique et rinçage sous un courant d'eau déionisée puis incubation 3  
20 à 5 minutes dans une solution de NaOH (60 µl NaOH 16N, 420 µl d'éthanol et 220 µl d'eau), et enfin rinçage sous un courant d'eau déionisée.

La différence entre deux mesures effectuées avant dépôt local mais avant et après un rinçage à l'eau est présentée en petits carrés à la figure 5a. Les croix représentent la différence entre une mesure effectuée  
25 après dépôt local de deux solutions différentes et une mesure faite avant le dépôt (la mesure faite avant le rinçage à l'eau).

Avec une pointe commerciale 23 (Telechem SMP3B) montée sur le dispositif 22 présenté à la figure 4, on dépose une solution de poly-L-lysine sur les transistors 64-69, les transistors 74-79, et les transistors 87-91.

30 Solution : Poly-L-lysine (0,01% poids/volume « w/v » final (P8920, Sigma)) dans un tampon PBS 0,1X à pH 7.

Après les dépôts locaux, l'échantillon est séché 15 minutes en atmosphère humide et ensuite 5 minutes à 50°C.

La poly-L-lysine est positive dans l'électrolyte de mesure (pH  
35 neutre) à cause des groupements amines ionisés. La diminution du courant

observé sur les dépôts de poly-L-lysine est compatible avec l'adsorption d'une charge positive sur la surface.

On mesure la différence de potentiel de surface  $\Delta U_{SG}$  correspondant à la mesure avant/après dépôt. Pour déterminer  $\Delta U_{SG}$ , on mesure la caractéristique bidimensionnelle par exemple  $I_D(U_{SG}, U_{SD})$  et on détermine les caractéristiques intrinsèques des 96 transistors en corrigeant numériquement les caractéristiques mesurées en fonction des résistances  $R_c$  des lignes de drain en série. La modification de l'état de l'interface  $SiO_2$  induit un changement de la caractéristique intrinsèque qui correspond à un décalage  $\Delta U_{SG}$  à  $U_{SD}$  et courant de drain  $I_D$  constants. Ce décalage permet d'obtenir directement une mesure indépendante du point de travail du transistor, contrairement au changement de courant  $\Delta I_D$  présenté dans la figure 5a. La valeur  $\Delta U_{SG}$  permet en première approximation de quantifier le changement de l'interface  $SiO_2$ /liquide induit par le dépôt local. Selon une variante, on fait varier  $U_{SG}$  de façon à garder  $I_D$  constant.

Les figures 5a à 5c montrent des mesures différentielles réalisées avant et après dépôt de poly-L-lysine (figure 5a), réalisées en fonction de la concentration en KCl (figure 5b), et réalisées en fonction de la concentration en poly-L-lysine déposée.

A la figure 5a, les variations  $\Delta I_D$  du courant de drain  $I_D$  sont représentées en ordonnée pour chacun des transistors 60 à 96 identifiés en abscisse ( $U_{SG} = 1$  V,  $U_{SD} = 0,9$  V et électrolyte KCl à 0,1 mM). Les différences  $\Delta I_D$  entre deux mesures réalisées avant un dépôt local mais séparées par un rinçage à l'eau sont représentées par des cercles. Les différences  $\Delta I_D$  correspondant à des mesures effectuées avant et après un dépôt local de poly-L-lysine sont représentées par des étoiles. Après le dépôt local on laisse l'échantillon 15 minutes à température ambiante en milieu humide, avant de le sécher à 50°C pendant 5 minutes. La dilution  $C_0$  de la poly-L-lysine est de 0,01 % poids/volume "W/V" final (P8920, Sigma) dans un tampon PBS 0,1x à pH 7.

A la figure 5b, les différences  $\Delta U_{SG}$  de la tension de source-grille  $U_{SG}$  sont mesurées sur une partie des transistors d'un réseau de 62 transistors FET avec  $U_{SD} = 1,2$  V et  $I_D = 50$   $\mu$ A. Les différences entre une mesure de référence (effectuée avant dépôt local et avec une concentration en KCl de 0,01 mM) et de deux séries de mesures (effectués après dépôt local de poly-L-lysine et avec différentes concentrations en KCl) sont

représentées par des cercles et des étoiles. Ici, un dépôt local de poly-L-lysine a été effectué dans deux zones distinctes avec la même dilution  $C_0$  que dans le cas de la figure 5a. Lors de chacune des deux séries de mesure, on fait varier la concentration de KCl dans le tampon de mesure entre 0,01 mM et 100 mM, en passant par les valeurs 0,1 mM, 1 mM et 10 mM. Entre les deux séries de mesure, on rince la surface à l'eau. On constate une sensibilité appréciable de la détection de la poly-L-lysine pour des concentrations de KCl entre 0,01 mM et 1 mM, et la hauteur des pics diminue progressivement au-delà de ces valeurs.

La figure 5c montre les variations  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  en fonction de la concentration en polymère déposé (poly-L-lysine), à savoir  $2C_0$ ,  $C_0$ ,  $C_0/2$ ,  $C_0/4$ ,  $C_0/8$  dans un tampon 0,1 x PBS pH 7,  $C_0$  ayant la valeur indiquée pour les mesures de la figure 5a. Les conditions de mesure sont les suivantes :  $U_{SD} = 1V$ ,  $I_D = 100 \mu A$ , et une concentration de 0,01 mM pour KCl. Ces mesures montrent qu'il n'y a pas avantage dans les conditions expérimentales choisies d'augmenter la concentration au-delà de  $C_0$ .

Les figures 6a et 6b montrent la détection électronique d'ADN. Les tensions  $U_{SG}$  et les variations  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  correspondent à un point de fonctionnement  $U_{SD} = 1V$ ,  $I_D = 100 \mu A$ , et à une concentration 0,01 mM en KCl. Elles sont obtenues à partir de la caractéristique  $I_D(U_{SG}, U_{SD})$  et sont reportées sur les courbes avec en abscisse le numéro des transistors FET (1 à 96).

Les étoiles représentent la mesure après traitement de surface initial à la soude. Les cercles représentent la mesure après incubation de poly-L-lysine sur tout le réseau. Pour permettre une immobilisation de l'ADN, on incube le réseau de transistors FET pendant 30 minutes dans une dilution de poly-L-lysine (concentration  $C_0$ ). Ensuite, sans effectuer de séchage préalable, on rince à l'eau et on sèche ensuite à l'air. L'incubation conduit à des décalages de la tension  $U_{SG}$  d'une valeur de  $97 \pm 50$  mV (statistique sur 67 surfaces préparées) qui réduisent les variations entre transistors dans le signal électronique. Ces décalages sont compatibles à ceux observés avec les valeurs mesurées en relation avec la figure 5c sur des dépôts locaux à la même concentration. Les carrés représentent les mesures après dépôt local d'oligonucléotides (5' Cy-5 modifiés 20 mer, concentration 50  $\mu M$  dans de l'eau désionisée) autour des transistors n° 30, 60 et 90. En niveau de gris et

au dessus de la figure 6a, est représentée l'image en microfluorescence des trois points d'ADN précités.

La figure 6b montre la détection électronique et par fluorescence d'oligonucléotides Cy5 modifiés. Les points représentés par des étoiles ont été obtenus par différence  $\Delta U_{SG}$  entre deux mesures électroniques réalisées avant et après 4 dépôts locaux avec des concentrations différentes en ADN (Ref. = 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M). Ils montrent la variation  $\Delta U_{SG}$  de la tension  $U_{SG}$  qui est observée dans les caractéristiques des transistors et qui est due aux dépôts locaux d'ADN. Les carrés montrent l'intensité de la fluorescence mesurée sur les transistors FET séchés, une fois la mesure électronique réalisée avec l'électrolyte. On notera que la même détection électronique est obtenue avec des oligonucléotides du même type, mais non modifiés.

Les figures 7a et 7b montrent un circuit intégré présentant des transistors T arrangés selon une ligne (ou plusieurs lignes). Deux canaux microfluidiques (par exemple parallèles)  $C_1$  et  $C_2$  d'un substrat 30 permettent de mettre un ou plusieurs transistors T à effet de champ en contact avec une solution de référence ou une solution contenant des molécules cibles qui circule dans un canal  $C_1$  et/ou  $C_2$ . Le matériau d'un substrat 30 qui comporte les canaux microfluidiques (ou capillaires) peut être un polymère PDMS (polydiméthylsiloxane) ou autre, un verre, du silicium, etc...

Il est ainsi possible de réaliser des mesures différentielles à partir de deux solutions qui circulent dans les deux canaux  $C_1$  et  $C_2$ . Il est également possible de réaliser sur un même substrat 30 un grand nombre de tels micro-canaux fluidiques, le substrat dans lequel ils sont ménagés étant solidarisé au substrat semi-conducteur dans lequel sont intégrés les transistors à effet de champ FET. Il est également possible de mesurer une variation à l'intérieur d'un canal donné. Cette variation peut être au cours du temps. Il est également possible d'injecter différentes solutions dans un capillaire et le profil des concentrations reste inchangé le long du canal, même loin du point d'injection. On se reportera à l'article de Paul J. A. KENIS et al., intitulé "Microfabrication inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning" paru dans SCIENCE, vol. 285, 2 Juillet 1999, p. 83-85 (notamment figure 1a).

Une technique d'analyse mettant en œuvre la microfluidique est décrite dans l'article "Monolithic integrated microfluidic DNA amplification



and capillary electrophoresis analysis system" de Eric T. LAGALLY et collaborateurs paru dans Sensors and Actuators B 63 (2000) p. 138-146.

La détection d'au moins une interaction spécifique entre des biomolécules sondes et les biomolécules cibles est avantageusement réalisée en mettant en œuvre un tampon de mesure dont la concentration en sel (par exemple KCl) est inférieure à celle du tampon de réaction.

Les biomolécules concernées (sources ou cibles) peuvent être par exemple de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des vitamines.

Les interactions spécifiques peuvent être par exemple des interactions ADN-ADN, ADN-ARN, ADN-protéines, ARN-protéines, protéines-protéines, ou bien encore vitamines-protéines. L'ADN peut être l'ADN oligonucléotide synthétisé chimiquement. On peut également réaliser des interactions avec un acide peptide nucléique "PNA".

Dans les exemples suivants, des étapes supplémentaires de mesure ont été rajoutées afin de vérifier l'état de surface du capteur (transistors FET), la qualité de la fixation des biomolécules sondes et la reproductibilité des mesures.

#### EXEMPLES

Produits :

NaOH: 60 microlitres NaOH 16N, 420 microlitres d'éthanol, 220 microlitres d'eau.

PLL: solution de poly-L-lysine, P8920 (Sigma), 0,01% w/v dans un tampon PBS 0,1x.

Oligonucléotide ARS3: 5' CCG CGA ACT GAC TCT CCG CC

Oligonucléotide ARS5: 5' CAG GCG GCA GGG CTG ACG TT

Oligonucléotide Cy3-ARS3sens: (complémentaire à ARS3 et avec fluorophore Cy3)

Oligonucléotide Cy5-ARS5sens: (complémentaire à ARS5 et avec fluorophore Cy5)

EXEMPLE 1 : Hybridation dans un tampon KCl de 50 mM et mesure avec un tampon KCl de 0,01 mM :

L'exemple montre qu'on peut obtenir des signaux plus importants en diminuant la concentration en sel de l'électrolyte de mesure par

rapport à celle de l'hybridation. L'hybridation spécifique est vérifiée par une mesure de contrôle par fluorescence.

1. Traitement global de la surface SiO<sub>2</sub>

Incubation 1 minute dans de l'acide sulfochromique, puis  
5 rinçage sous un courant d'eau déionisée, et séchage à l'air comprimé. Ce cycle d'incubation, rinçage, séchage est répété une fois.

Incubation 4 minutes dans la solution de NaOH.

Rinçage à l'eau et séchage.

2. Mesure électronique après traitement NaOH

10 Tampon de mesure: KCl à la concentration de 0,01 mM. (voir figure 8a)

Cette mesure est suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage.

3. Traitement global poly-L-lysine

On réalise une incubation pendant 2h.

15 Cette incubation est suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage.

4. Mesure électronique "PL1".

Tampon de mesure: KCl 0,01 mM (voir figure 8a).

Cette mesure est suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage.

20

5. Mesure électronique "PL2".

Tampon de mesure: KCl 0,01 mM.

Cette mesure est suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage.

Cette deuxième mesure a pour but de vérifier la stabilité de la

25 mesure à ce stade.

6. Dépôt des sondes d'ADN.

Avec une micropipette, on dépose sur la partie gauche du réseau de FET 0,2 microlitres d'une solution contenant l'oligonucléotide ars5. Sur la partie droite du réseau, on dépose 0,2 microlitres d'une solution  
30 contenant l'oligonucléotide Ars3. Dans les deux cas, les dilutions contiennent 1 micromole d'oligonucléotide dans un tampon KCl de 50mM. On réalise une incubation pendant 15 minutes, en atmosphère humide, pour éviter le séchage.

35 Cette incubation est suivie d'un rinçage à l'eau et d'un séchage.

### 7. Mesure électronique "Sonde1"

On utilise un tampon de mesure: KCl 0,01 mM.

La Figure 8b montre les différences Delta  $U_{GS}$  entre la mesure "Sonde1" effectuée après le dépôt des biomolécules sondes et la mesure PL2 (étape 5) effectuée avant ce dépôt.

La courbe "Sonde1-PL2" (concentration en KCl : 0,01 Mm) montre un décalage de 25 mV pour les deux régions de dépôt gauche (dépôt de Ars3 sur les transistors 1 à 13) et droite (dépôt de Ars5 sur les transistors 21 à 31). Avec cette valeur, nous avons une concentration suffisante de biomolécules sondes et ne sommes pas encore trop proches de la saturation.

On réalise ensuite un pompage de l'électrolyte et on le remplace par 1 ml de KCl à 50 mM, sans séchage.

### 8. Mesure électronique "Sonde2"

Tampon de mesure: KCl à la concentration de 50 mM.

Comme le montre la Figure 8b, on ne voit plus les dépôts.

Pas de rinçage. Une mesure électronique "Sonde 3" est réalisée (KCl à 50 mM) pour vérifier la stabilité (Figure 8c).

### 9. Hybridation 1 (avec Cy5-Ars5sens).

Lors de la mesure "Sonde2" (étape 8) il y avait 1 ml de KCl sur les transistors FET.

Après, on ajoute directement (sans rinçage) 100  $\mu$ l de Cy5Ars5sens à 1  $\mu$ M.

La dilution finale en oligonucléotides est alors de l'ordre de 100 nM. On agite par pompage et on redépose 2 fois cette solution. Après agitation, la réaction de reconnaissance se fait pendant 5 minutes à l'abri de la lumière (pour éviter le blanchiment ou "bleaching" des fluorophores).

Après 5 minutes on rince: pompage de l'électrolyte et ajout de 1 ml de KCl

50mM, agitation, suivie d'un nouveau pompage ..., Ce cycle est réitéré 3 fois. Ces rinçages arrêtent la réaction. Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

### 10. Mesure électronique "Hyb1"

On plonge l'électrode dans le tampon de KCl 50 mM et fait la mesure électronique.

La courbe résultante Hyb1-Sonde 3 est représentée à la Figure 8d .

Le décalage Delta  $U_{SG}$  entre les mesures référencées Hyb1 et Sonde3 est d'environ +3.9 mV sur la région Ars3 et d'environ +2.3 mV sur la région Ars5 (ici les biomolécules sondes et les biomolécules cibles ont des séquences complémentaires). Ce décalage est d'environ -1.6 mV sur la région centrale sans dépôt de sondes d'ADN (transistors 14 à 20).

Après cette mesure on rince: pompage de l'électrolyte et ajout de 1 ml de KCl 0,01mM, agitation, repompage ..., réiteration 5 fois. Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

#### 11. Mesure électronique "Hyb12"

On plonge l'électrode de mesure dans le tampon de KCl 0,01 mM et on fait la mesure électronique.

La courbe résultante (Hyb12 – Sonde 1) est représentée à la figure 8e. Les signes des décalages correspondent à ceux qui ont été observés à 50 mM (mesure "Hyb1"), mais les niveaux de ces décalages sont plus importants.

Dans la région Ars5 (Ars3) on observe un décalage moyen de +40 mV (+49 mV) entre les mesures "Hyb12" et "Sonde1", effectuées à 0,01 mM KCl.

#### 12. Hybridation 2 (avec Cy3-Ars3sens)

On pompe l'électrolyte KCl 0,01 mM et on le remplace par 1 ml de KCl 50 mM. Après, on ajoute directement (sans rinçage) 100 µl de Cy3Ars3sens à 1 µM.

La dilution finale en oligonucléotides est alors de l'ordre de 100 nM.

On agite par pompage et on redépose 2 fois cette solution . Après agitation, la réaction de reconnaissance se fait pendant 5 minutes à l'abri de la lumière.

Une fois ces 5 minutes écoulées, on rince, puis on pompe l'électrolyte après quoi on ajoute 1 ml de KCl à 50mM. On agite, on pompe de nouveau. Ce cycle (rinçage, agitation, pompage) est réitéré 3 fois. Ces rinçages terminent la réaction. Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

### 13. Mesure électronique "Hyb2"

On plonge l'électrode dans le tampon de KCl à 50 mM et on effectue la mesure électronique. Le résultat de ces mesures est représenté par la courbe Hyb2 – Sonde3 de la Figure 8d.

On observe sur la figure 8d, que la différence Delta  $U_{SG}$  entre les mesures référencées

Hyb1 et Sonde3 est plus positive sur la région Ars3 (à gauche) que sur la région Ars5 (à droite, où les sondes et cibles ont des séquences complémentaires pour l'hybridation 1). Cette tendance est inversée pour la différence entre Hyb2 et Sonde2, en accord avec le fait que pour l'hybridation 2 les biomolécules sondes et cibles ont des séquences complémentaires sur la région Ars3.

Après cette mesure on rince: pompage de l'électrolyte et ajout de 1 ml de

KCl 0,01mM, agitation, repompage ..., réitération 5 fois.

Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

### 14. Mesure électronique "Hyb22".

On plonge l'électrode dans le tampon de KCl 0,01 mM et fait la mesure électronique. Le résultat est représenté par la courbe Hyb22 – Sonde 1 de la Figure 8f.

Les signes des décalages sont renversés par rapport à ceux observés à 50 mM (mesure "Hyb2") et les signaux sont plus importants.

Dans la région Ars5 (Ars3) on observe un décalage moyen de -11 mV (+1 mV) entre les mesures "Hyb22" et "Hyb12".

Après cette mesure, on réalise un rinçage à l'eau et un séchage.

### 15. Mesures de fluorescence.

Avec un dispositif de mesure de fluorescence à deux couleurs on vérifie l'hybridation spécifique.

Sous excitation à 633 nm (Cy5) on observe plus de fluorescence sur la région Ars5 (Figure 8h).

Sous excitation à 532 nm (Cy3) on observe plus de fluorescence sur la région Ars3 (Figure 8g).

### CONCLUSION

Mesures à 50 mM et hybridation avec Ars5Sens: le décalage de la région Ars5 est 1.6 mV plus négatif que celui de la région Ars3.

5 Mesures à 50 mM et hybridation avec Ars3Sens: le décalage de la région Ars3 est 5,4 mV plus négatif que celui de la région Ars5.

Mesures à 0,01 mM et hybridation avec Ars5Sens: le décalage de la région Ars5 est 9 mV plus négatif que celui de la région Ars3.

Mesures à 0,01 mM et hybridation avec Ars5Sens: le décalage de la région Ars3 est 22 mV plus négatif que celui de la région Ars3.

10 L'hybridation spécifique est vérifiée par la mesure de fluorescence.

### EXEMPLE 2 : Hybridation avec micro-dépôt et changement de tampon 20 mM/0.01 mM.

Les étapes 1 à 5 sont identiques à celles de l'exemple 1.

#### 15 6- Dépôt des sondes d'ADN.

Avec un système de microdéposition commercial (GeSim, Rossendorf, Allemagne, Nano-plotter NP1), on dépose sensiblement 0,2 nl d'une solution contenant l'oligonucléotide ars5 sur la partie gauche du réseau de transistors FET. Sur la partie droite de ce réseau, on dépose 0,2 nl d'une  
20 solution contenant l'oligonucléotide Ars3. Au centre on dépose un mélange d'Ars5 et d'Ars3. Dans tous les cas, les dilutions contiennent 1µM (1 micromole) d'oligonucléotide dans un tampon d'eau déionisée. Les sondes sèchent quelques secondes après le dépôt à température et humidité ordinaires.

25 Pas de rinçage.

#### 7. Mesure électronique "Sonde1"

Tampon de mesure: KCl 0,01 mM.

30 La courbe Sonde 1-PL2 de la Figure 9a montre les différences Delta  $U_{SG}$  entre des mesures faites après le dépôt des sondes et la mesure PL2 effectuée avant ce dépôt (avec le même tampon de mesure).

La courbe "Sonde1-PL2" montre que le dépôt des oligonucléotides a induit des décalages Delta  $U_{SG}$  compris entre -20 et -25 mV.

35 La mesure est suivie d'un pompage de l'électrolyte et son remplacement par 1 ml de KCl à 20 mM, sans séchage.

### 8. Mesure électronique "Sonde2"

Tampon de mesure: KCl 20 mM.

Les résultats sont représentés à la Figure 9a par la courbe  
Sonde 2-PL2 (tampon de mesure 20 mM). On voit toujours les dépôts, mais  
5 les pics sont plus petits qu'avec le tampon de mesure à 0,01 mM.

Pas de rinçage.

### 9. Mesures électroniques "Sonde3" et "Sonde4"

Tampon de mesure: KCl 20 mM.

Ces mesures ont pour but de vérifier la stabilité.

10 Pas de rinçage.

### 10. Hybridation 1 (avec Cy3-Ars5sens)

Lors de la mesure "Sonde4", il y avait 1 ml de KCl sur les  
FETs. Après, on ajoute directement (sans rinçage) 100 µl de Cy3Ars5sens à  
1 µM. La dilution finale en oligonucléotides est alors d'environ 100 nM. On  
15 agite par pompage et on redépose 2 fois cette solution. Après agitation, la  
réaction de reconnaissance se fait pendant 5 minutes à l'abri de la lumière.

Après ces 5 minutes on rince: pompage de l'électrolyte et  
ajout de 1 ml de KCl

20 20 mM, ce cycle étant réitéré 3 fois. Ces rinçages terminent la  
réaction. Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

### 11. Mesure électronique "Hyb1"

On plonge l'électrode dans le tampon de KCl 20 mM et on  
effectue la mesure électronique.

25 Le résultat est représenté par la courbe "Hyb1 – Sonde 4" de  
la Figure 9b.

Le décalage Delta  $U_{SG}$  entre les mesures référencées Hyb1 et  
Sonde 4 est d'environ -21 mV sur la région Ars3 (transistors 71 à 81) et  
d'environ -25 mV sur la région Ars5 (transistors 11 à 19). Ici, sur la région  
Ars5, les biomolécules sondes et cibles ont des séquences complémentaires.

30 Après cette mesure on rince: pompage de l'électrolyte et ajout  
de 1 ml de KCl 0.01mM, agitation, repompage ..., réitération 5 fois.

Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la  
surface.

### 12. Mesure électronique "Hyb12"

35 On plonge l'électrode dans le tampon de KCl 0,01 mM et on  
effectue la mesure électronique. Le résultat est représenté à la Figure 9c.

Les signes des décalages correspondent à ceux qui ont été observés avec un tampon de mesure de concentration 20 mM, mais les signaux sont plus importants.

5 Dans la région Ars5 (Ars3) on observe un décalage moyen de -61 mV (-41 mV) entre les mesures "Hyb12" et "Sonde1".

Après cette mesure on rince: pompage de l'électrolyte et ajout de 1 ml de

KCl 20 mM, agitation, repompage ..., réitération 5 fois. Pendant cette étape il n'y a à aucun moment séchage sur la surface.

10 13. Mesure de fluorescence.

Avec un dispositif de mesure de fluorescence à deux couleurs on vérifie l'hybridation spécifique.

Sous excitation à 532 nm (figure 9d), on observe plus de fluorescence sur la région Ars5. Ceci confirme l'hybridation spécifique.

15 CONCLUSIONS

Mesures à 20 mM et hybridation avec Ars5Sens: le décalage de la région Ars5 est 3,8 mV plus négatif que celui de la région Ars3.

20 Mesures à 0,01 mM et hybridation avec Ars5Sens: le décalage de la région Ars5 est 20,7 mV plus négatif que celui de la région Ars3.

L'hybridation spécifique est vérifiée par la mesure de fluorescence.

La mesure de référence réalisée avec des molécules sondes non soumises ou non encore soumises à une interaction avec des molécules  
25 cibles peut être effectuée sur une ou plusieurs zones actives distinctes de celle ou celles où intervient une dite réaction d'interaction avec des molécules cibles. Les zones actives d'un même circuit intégré peuvent être utilisées pour différentes interactions, ce qui permet d'effectuer en parallèles plusieurs mesures de types différents correspondant par exemple à différentes  
30 interactions, et/ou à l'étude des différentes biomolécules cibles. On peut ainsi détecter plusieurs interactions par rapport à une ou plusieurs mesures de référence réalisée sur des molécules sondes non soumises à interactions. On peut également détecter des interactions par comparaisons entre elles de mesures réalisés sur des molécules ayant été soumises à différentes



interactions, par exemple entre des molécules sondes de même type, par exemple ADN, ayant ou non les mêmes séquences, et des biomolécules cibles identiques ou différentes.

Deux exemples d'applications potentielles de l'invention sont  
5 donnés ci-après :

Un exemple est l'étude de l'expression des gènes. On s'intéresse ici à la quantité relative des différentes molécules d'ARN messagers, extraites des cellules. On greffe des molécules sondes d'ADN qui portent des séquences de bases différentes à des endroits différents de la  
10 surface de la puce. Chaque sonde d'ADN est choisie de façon à interagir spécifiquement avec un type de molécule d'ARN (caractérisé par sa séquence). Le nombre relatif de molécules d'ARN hybridés sur deux régions de sondes différentes donne l'abondance relative de deux types de molécules d'ARN (et avec cela le niveau relatif de l'expression des deux gènes  
15 correspondants). L'intérêt est de suivre un grand nombre de gènes en parallèle, pour des études du développement, pour une caractérisation génétique des pathologies, pour une analyse moléculaire de l'effet des médicaments, etc...

Un autre exemple concerne la détection des mutations sur  
20 puces à ADN. Ici on cherche à analyser l'ADN d'un patient, en cherchant en parallèle la présence (ou l'absence) de plusieurs mutations connues. Pour cela, on greffe différents oligonucléotides (typiquement des 12mers) à différents endroits de la puce. Les séquences de base et les conditions d'hybridation (sel, température, etc) sont optimisées pour que la présence  
25 d'une mutation (même ponctuelle) induise une différence mesurable dans les taux d'hybridation des différentes sondes. L'échantillon de molécule cible consiste ici souvent en des molécules d'ADN double brin obtenues par "PCR" à partir d'une faible quantité d'ADN génomique du patient.

Dans les deux cas, on s'intéresse à la différence des signaux  
30 induits par l'hybridation d'un échantillon complexe contenant un grand nombre de biomolécules cibles différentes sur une puce avec plusieurs régions de

sondes différentes (souvent le même type de molécule mais avec une séquence différente). Cette configuration est très intéressante pour la détection électronique des interactions.

On comprend que les expressions « deux interactions  
5 différentes » et « autre interaction » couvrent la situation où cette différence d'interaction correspond à deux sondes de type ou de séquence différente, mais en contact avec une même solution de molécule cible.

La détection d'une interactivité spécifique peut s'effectuer sur une ou plusieurs régions de porte du réseau de transistors à effet du champ  
10 FET. L'avantage d'utiliser plusieurs régions de porte permet de mettre en évidence les inhomogénéités.

Alternativement, l'utilisation d'un seul transistor du réseau est possible pour des biomolécules sondes d'un type donné et une interaction donnée. Si on utilise un transistor de grandes dimensions, on obtient  
15 directement une mesure moyennée des inhomogénéités.

### **REVENDEICATIONS**

- 1) Procédé de détection électronique d'au moins une interaction spécifique entre des molécules sondes fixées sur au moins à une zone active d'un capteur et des biomolécules cibles, caractérisé en ce que ledit capteur est constitué par un réseau de transistors à effet de champ ( $T_1$ ,  $T_2$ , ...) dont chacun présente une région de source (5), une région de drain (D), ainsi qu'une région de porte qui constitue une zone active (3) sur laquelle ladite interaction spécifique doit être détectée, et caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
- 5
- a) mettre en contact au moins une dite zone active (3) avec des molécules sondes d'un type donné fixées sur ladite zone active.
- 10
- b) mettre en contact au moins certaines des molécules sondes avec des biomolécules cibles susceptibles d'interagir avec lesdites molécules sondes et effectuer une dite interaction dans un tampon réactionnel ayant une première concentration en sel.
- 15
- c) mesurer au moins un point de la caractéristique courant de drain/tension source-porte/tension source-drain d'au moins un transistor dudit réseau pour détecter ladite interaction spécifique au moins pour un point de mesure obtenu dans un tampon de mesure ayant une deuxième concentration en sel qui est inférieure à la première concentration pour des molécules sondes ayant été soumises à ladite interaction spécifique
- 20
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite mesure est effectuée par différence entre ledit point de mesure et un point de référence, notamment dans un dit tampon de mesure, pour des molécules sondes n'ayant pas été soumises à une interaction spécifique.
- 25
- 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit point de référence est déterminé à partir de molécules sondes du même type que celles qui ont été soumises à ladite interaction spécifique, et présentant soit la même séquence, soit une séquence différente.
- 30
- 4) Procédé selon une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que la mesure différentielle de l'étape c) est réalisée sur deux groupes

de molécules sondes fixées sur des zones actives (3) distinctes, les biomolécules sondes de l'un des groupes ayant été soumises à l'interaction de l'étape b) et l'autre pas.

5 5) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape c est réalisé de manière différentielle entre deux points de mesure obtenus dans un dit tampon de mesure pour des molécules sondes ayant été soumises à deux interactions différentes.

10 6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les molécules sondes soumises auxdites deux interactions différentes sont du même type, qu'elles aient ou non des séquences identiques.

7) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite mesure différentielle de l'étape c est réalisée sur deux groupes de molécules sondes fixées sur des zones actives (3) distinctes, les molécules sondes de l'un des groupes ayant été soumises à ladite interaction spécifique et les molécules sondes de l'autre groupe ayant été soumises à une autre interaction spécifique.

20 8) Procédé selon une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que la mesure différentielle de l'étape c) est réalisée sur les mêmes molécules sondes avant et après qu'elles soient soumises à ladite interaction lors de l'étape b).

25 9) Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite mesure d'au moins un point de la caractéristique met en œuvre l'application d'une tension donnée ( $U_{DS}$ ) entre le drain et la source d'au moins un transistor, ainsi que l'application dans un premier cas d'une tension donnée ( $U_{GS}$ ) entre la porte et la source dudit transistor, dans un deuxième cas d'un courant de drain ( $I_D$ ) donné audit transistor.

10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que dans le premier cas, le point est obtenu en mesurant le courant de drain  $I_D$  et dans le deuxième cas en mesurant la tension  $U_{GS}$  entre la porte et la source.

30 11) Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le tampon de mesure est du KCl.

12) Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration du tampon réactionnel est comprise entre 20m M et 1 M.

5 13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la concentration du tampon de mesure est supérieur à 0,002 m M et inférieur à 20m M.

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la concentration du tampon de mesure est au moins égale à 0, 01m M.

10 15) Procédé selon une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que la concentration du tampon de mesure est au plus égale à 15m M.

16) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le passage entre un tampon à un tampon de concentration inférieure est séparé par une étape de rinçage.

15 17) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les molécules sondes sont des molécules, notamment des biomolécules, susceptibles d'être reconnues par un type de biomolécule cible.

20 18) Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que les molécules sondes et/ou les biomolécules cibles sont des molécules d'ADN, d'ARN ou de protéines, ou bien encore des vitamines.

25 19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que les biomolécules sondes sont des molécules d'ADN et en ce que les transistors à effet de champ sont de type à canal n à appauvrissement, avec une polarisation de porte négative.

20) Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte avant a) au moins une étape de mesure de contrôle avec un dit tampon de mesure.

30 21) Procédé selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comporte la circulation à travers au moins un microcanal fluidique d'au moins une solution qui constitue une référence ou qui contient des molécules cibles pour la mettre en contact avec au moins un dit transistor à effet de champ.

1/20

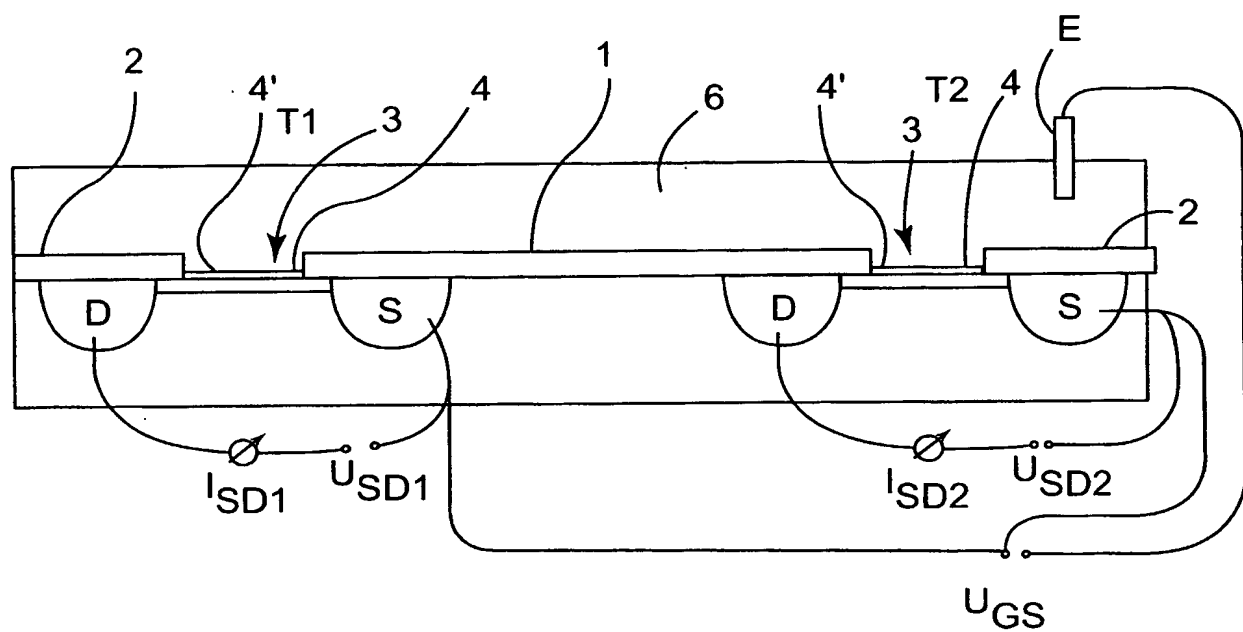


Fig.1

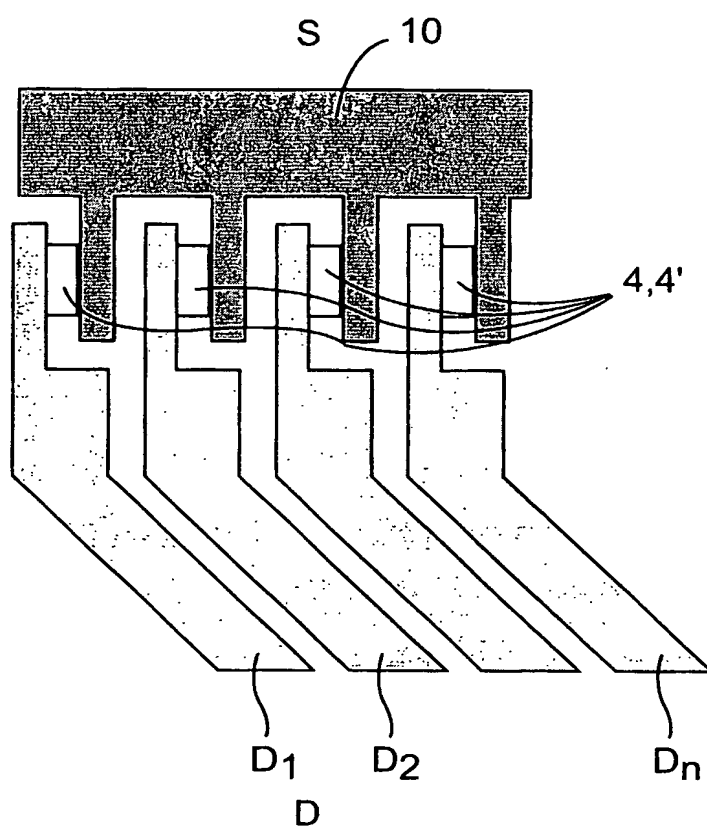


Fig.2

3/20

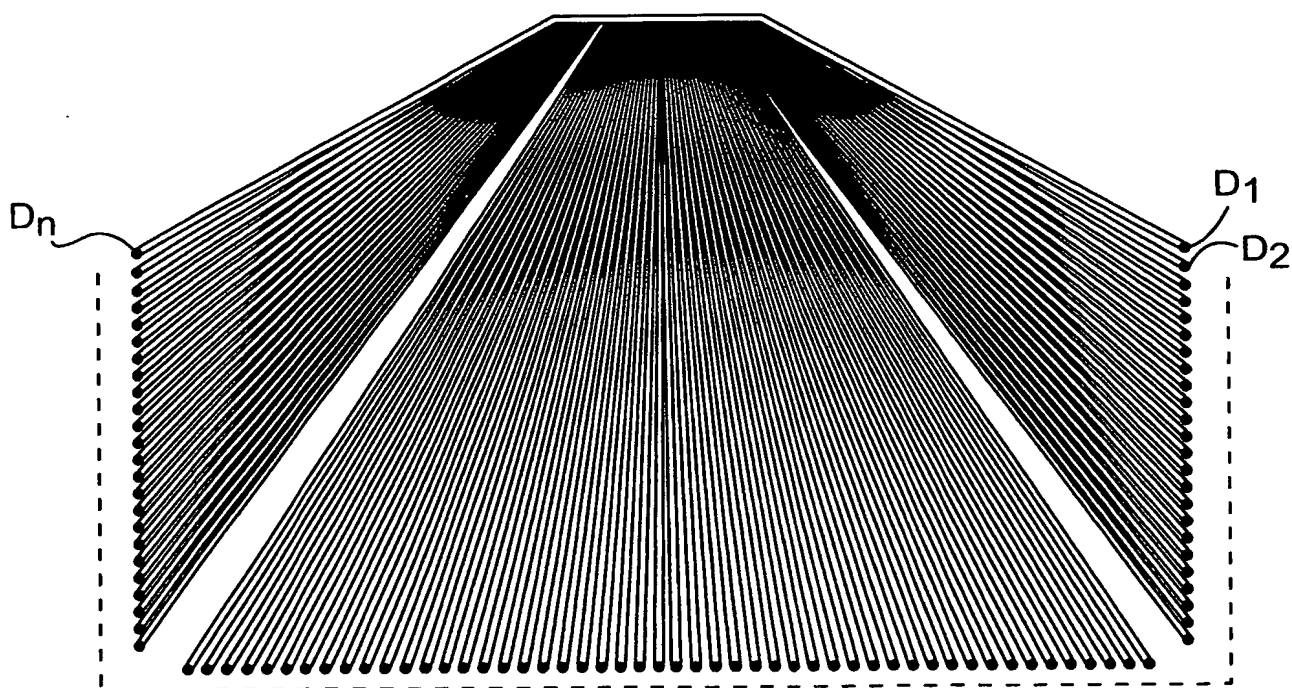


Fig.3



4/20

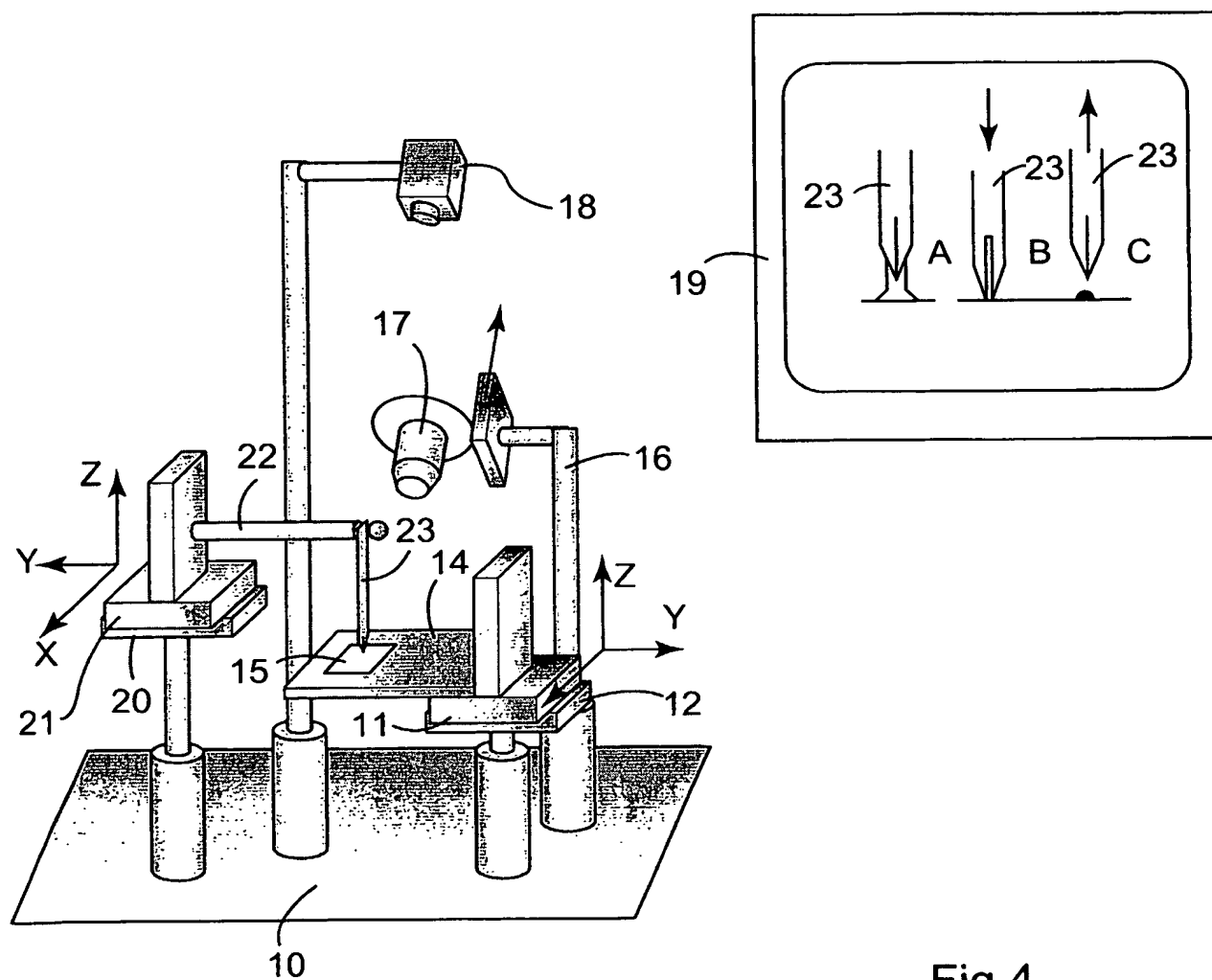


Fig.4

5/20

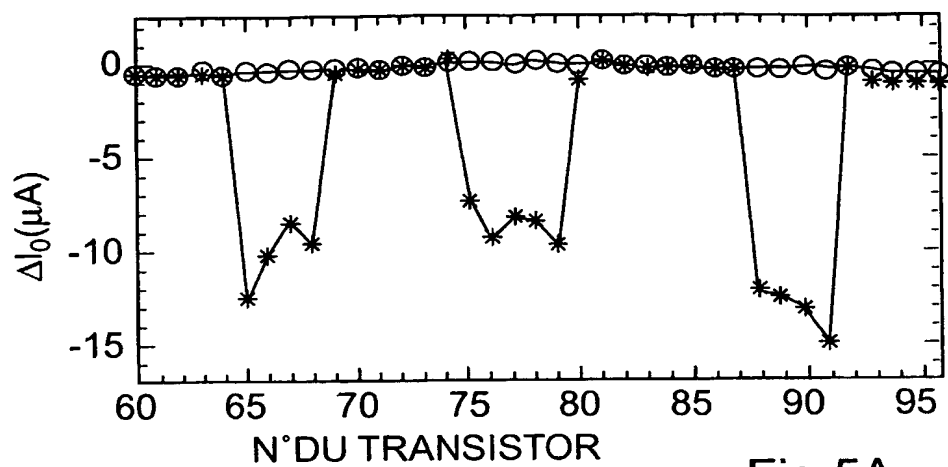


Fig.5A

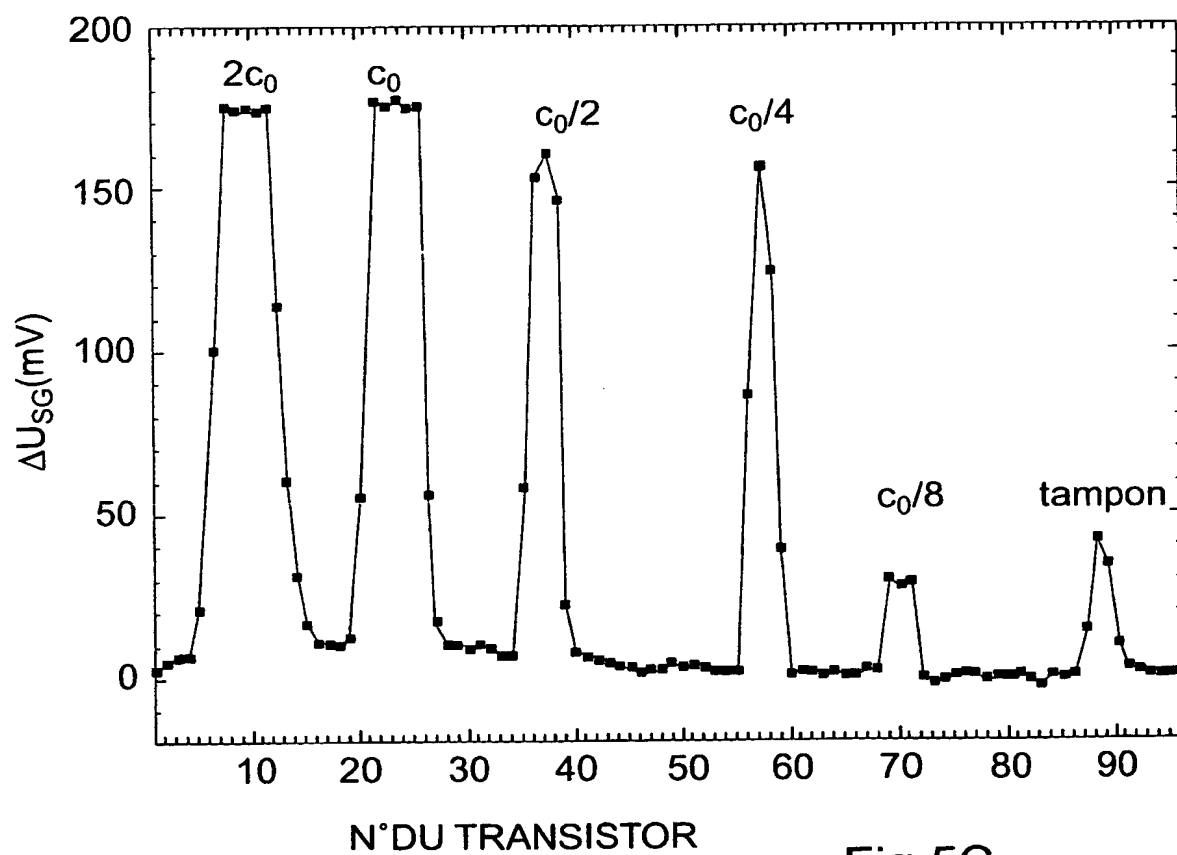
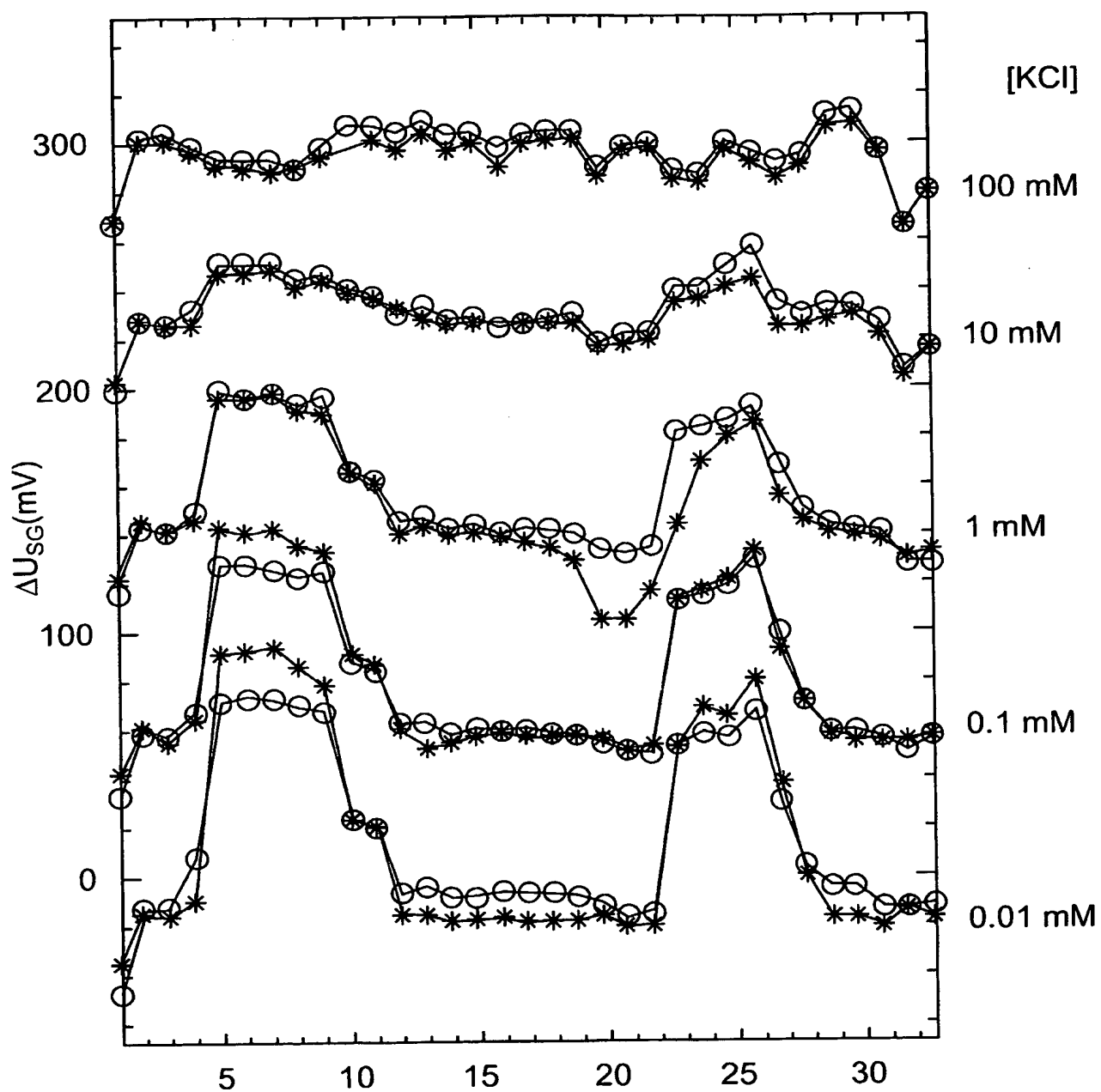


Fig.5C

6/20



N° DU TRANSISTOR

Fig.5B

7/20

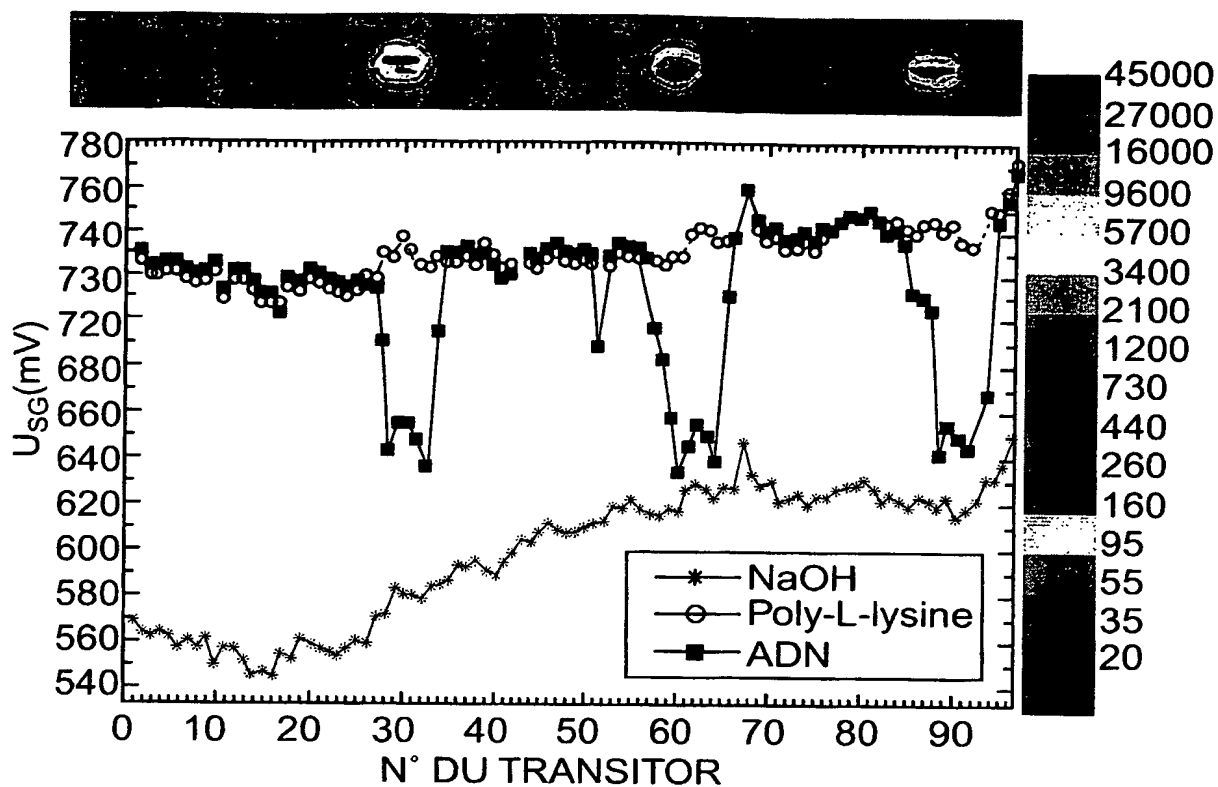


FIG. 6A

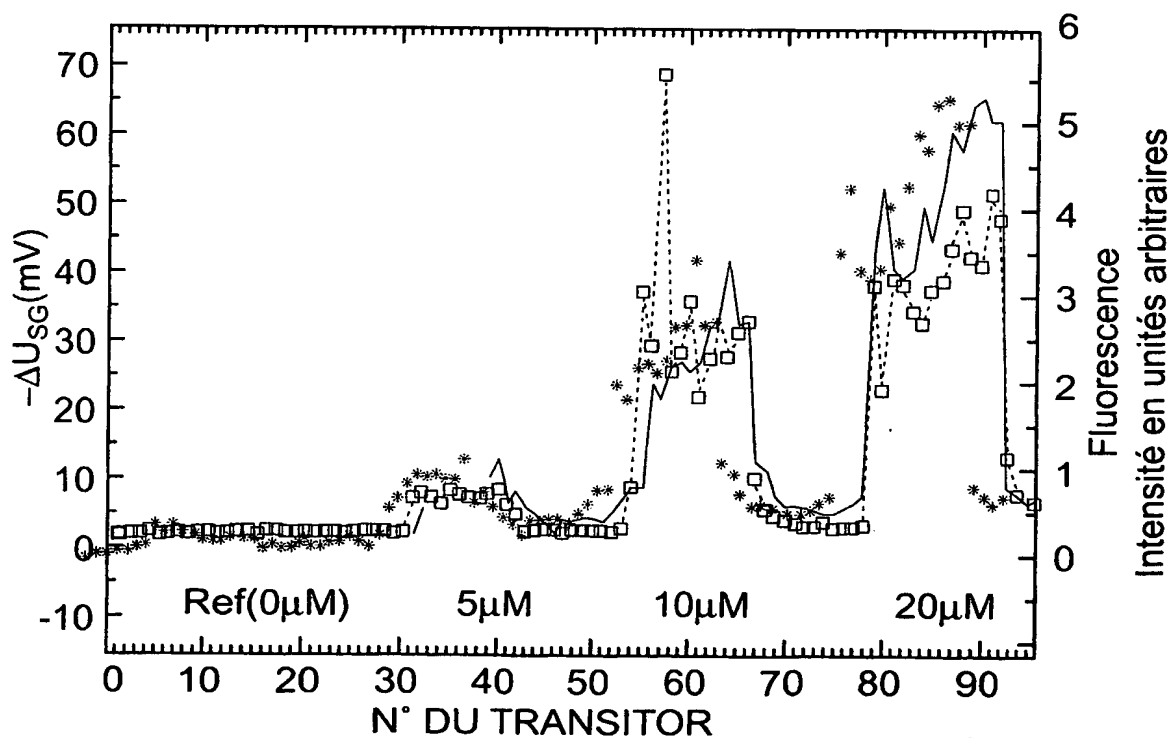


FIG. 6B

8 /20

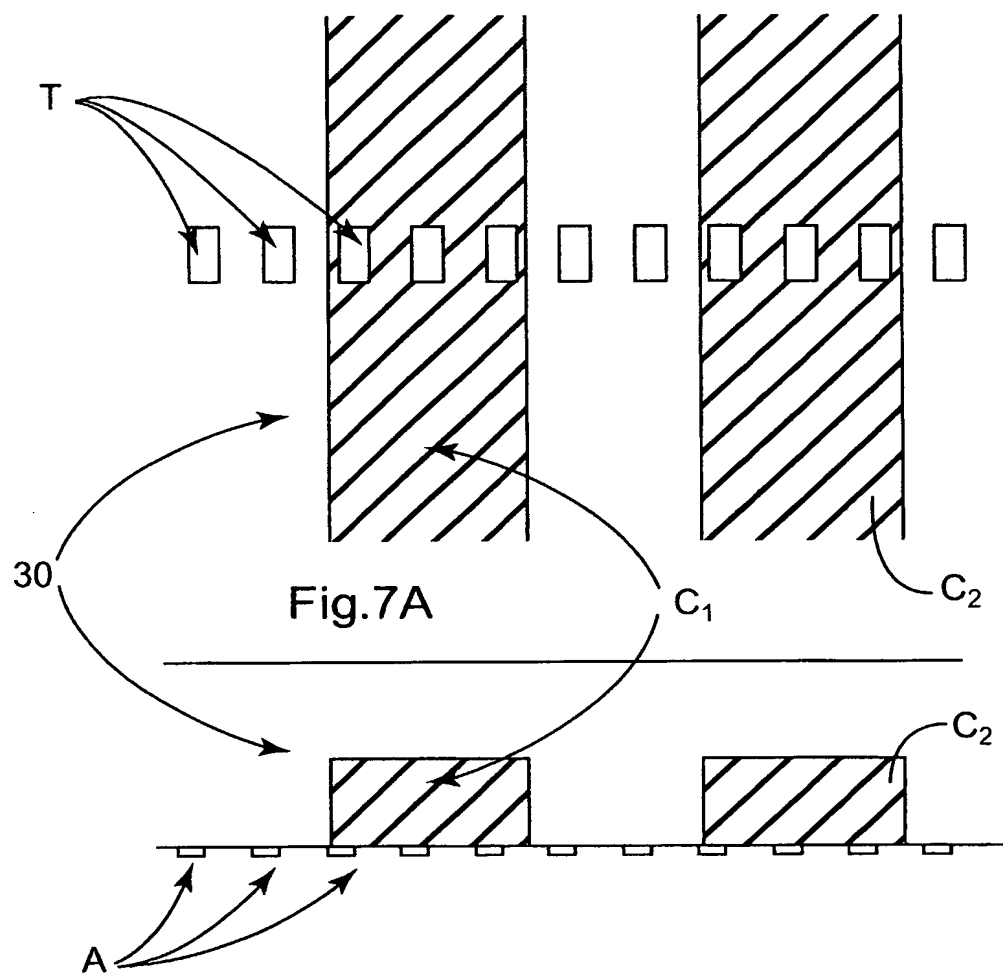


Fig.7B

9/20

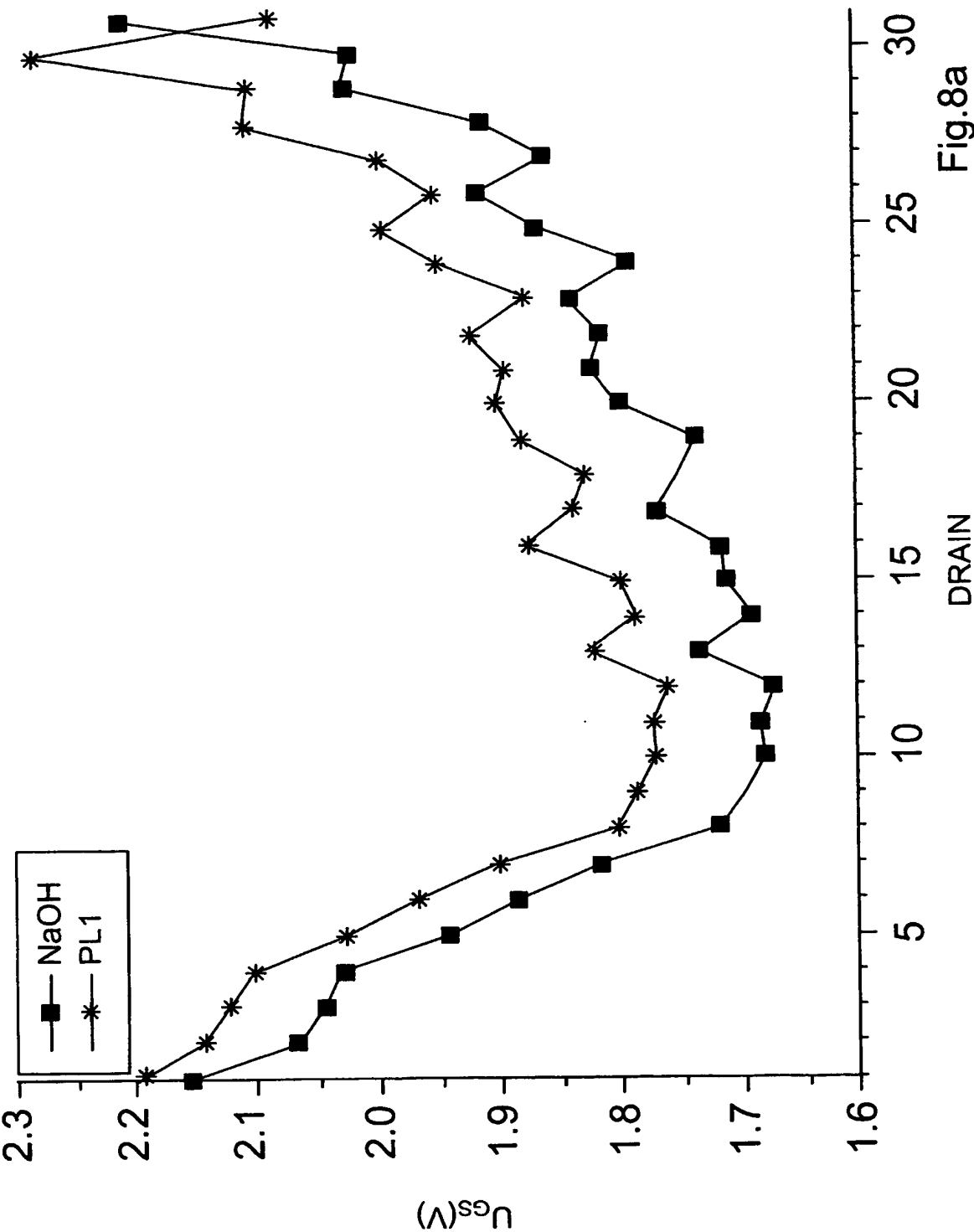


Fig.8a

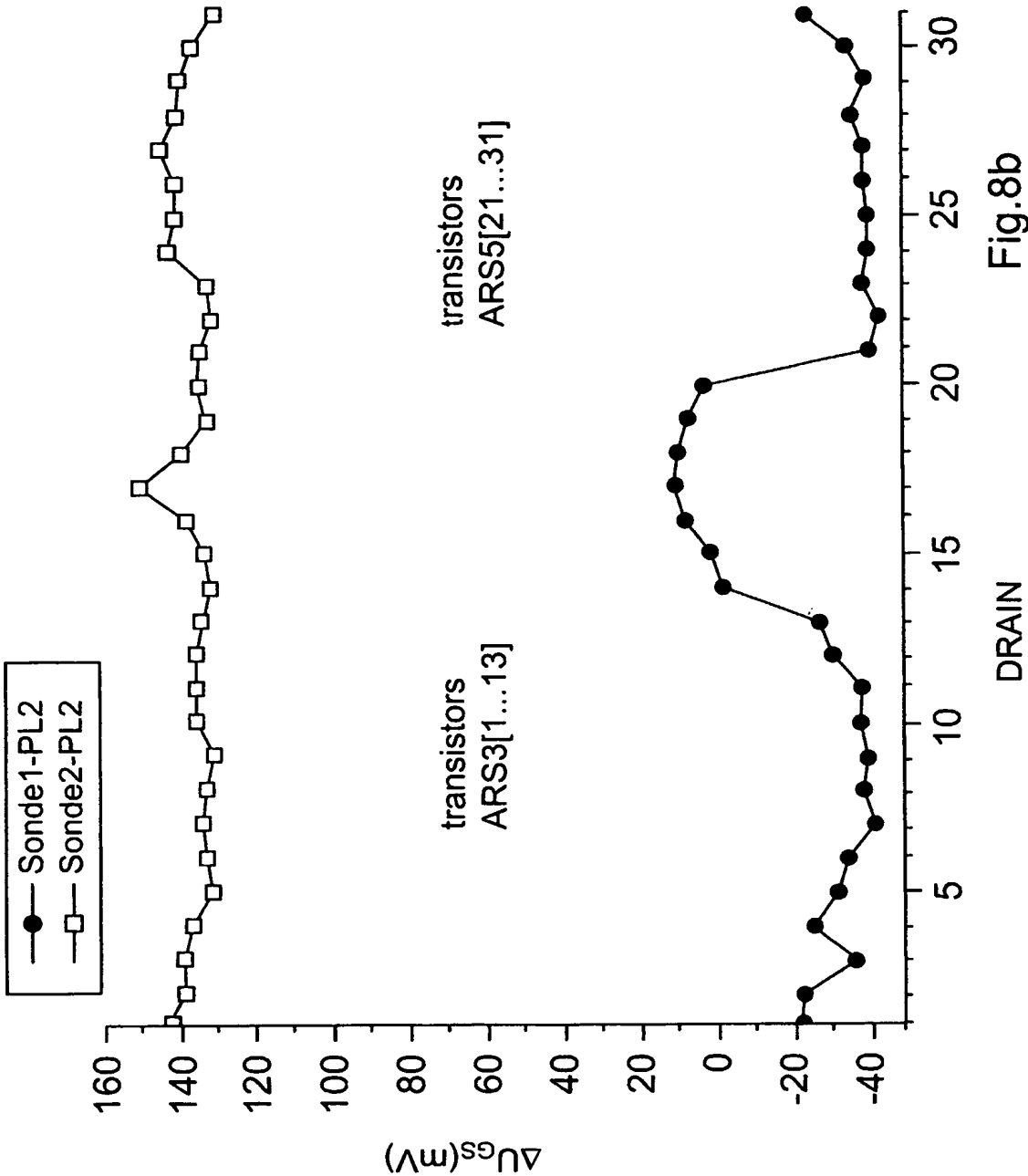
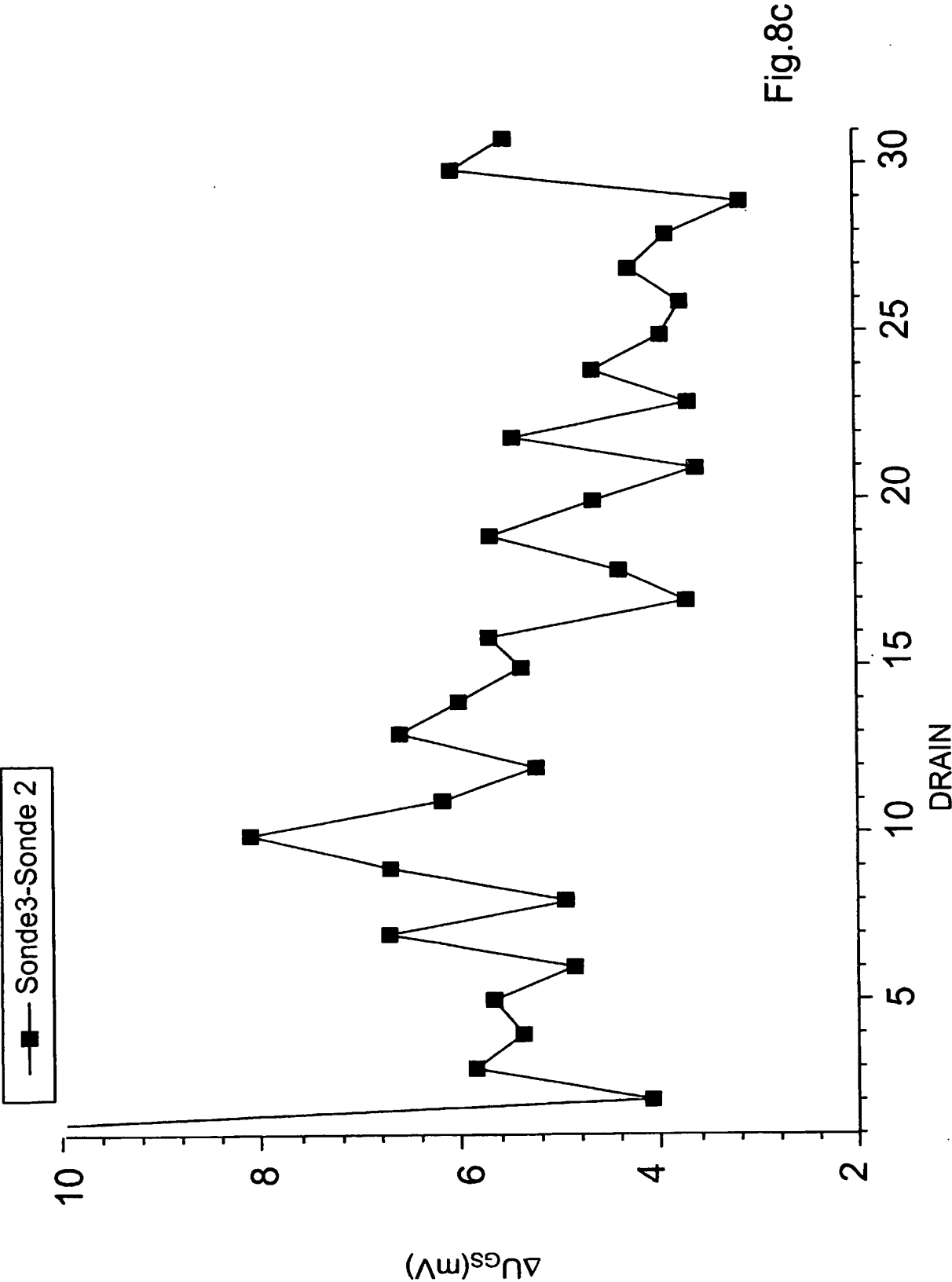


Fig.8b

11/20





12/20

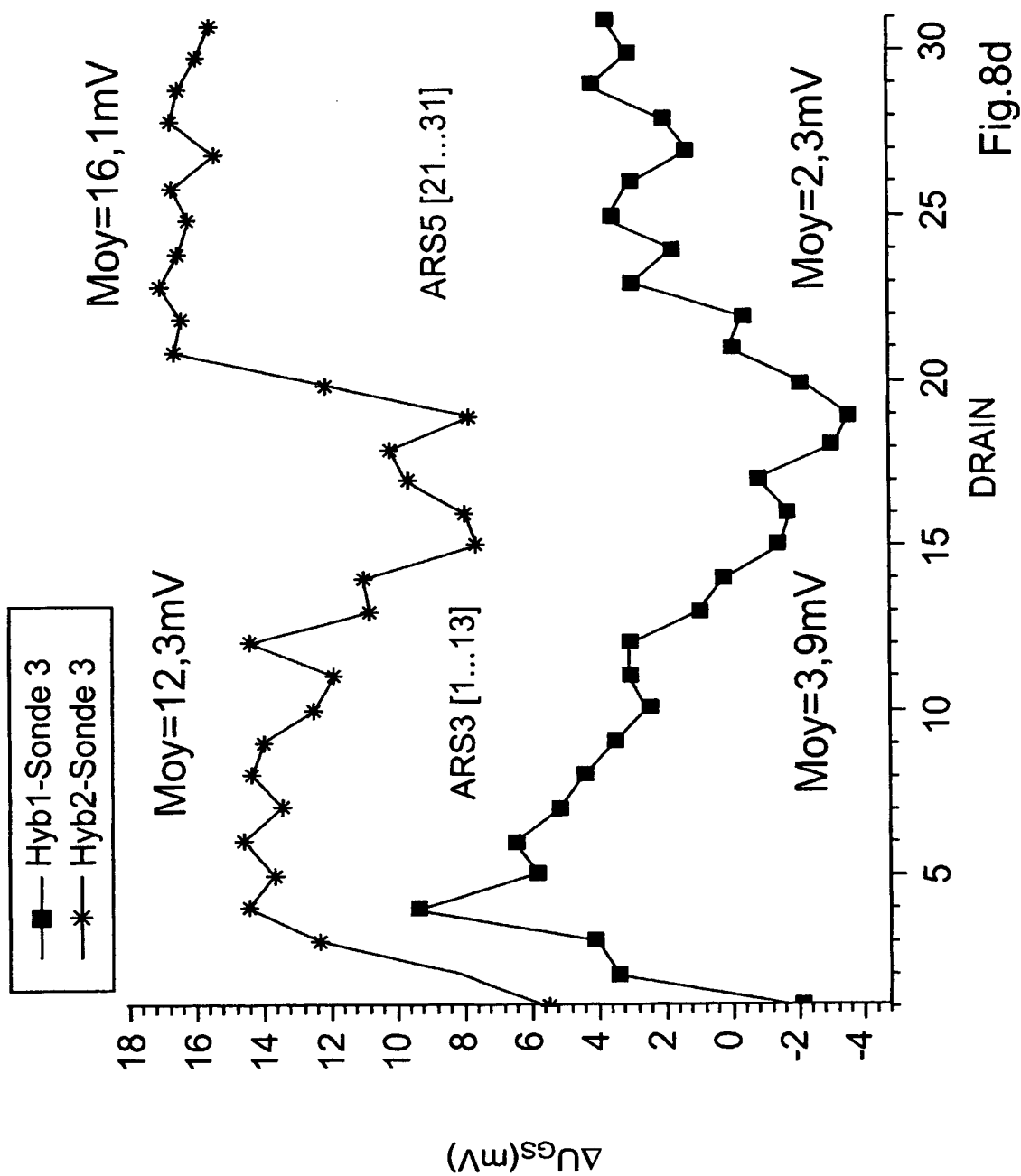
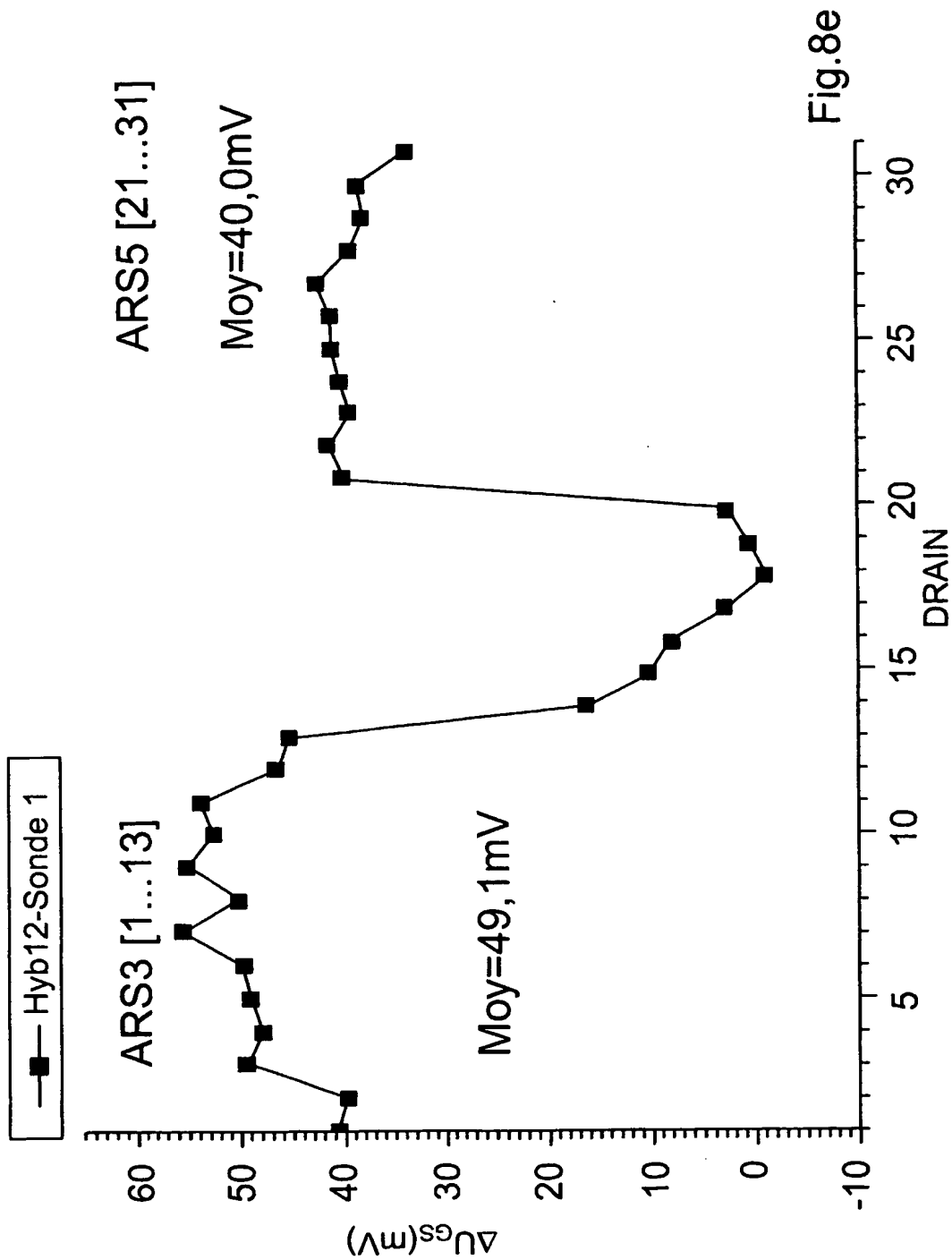
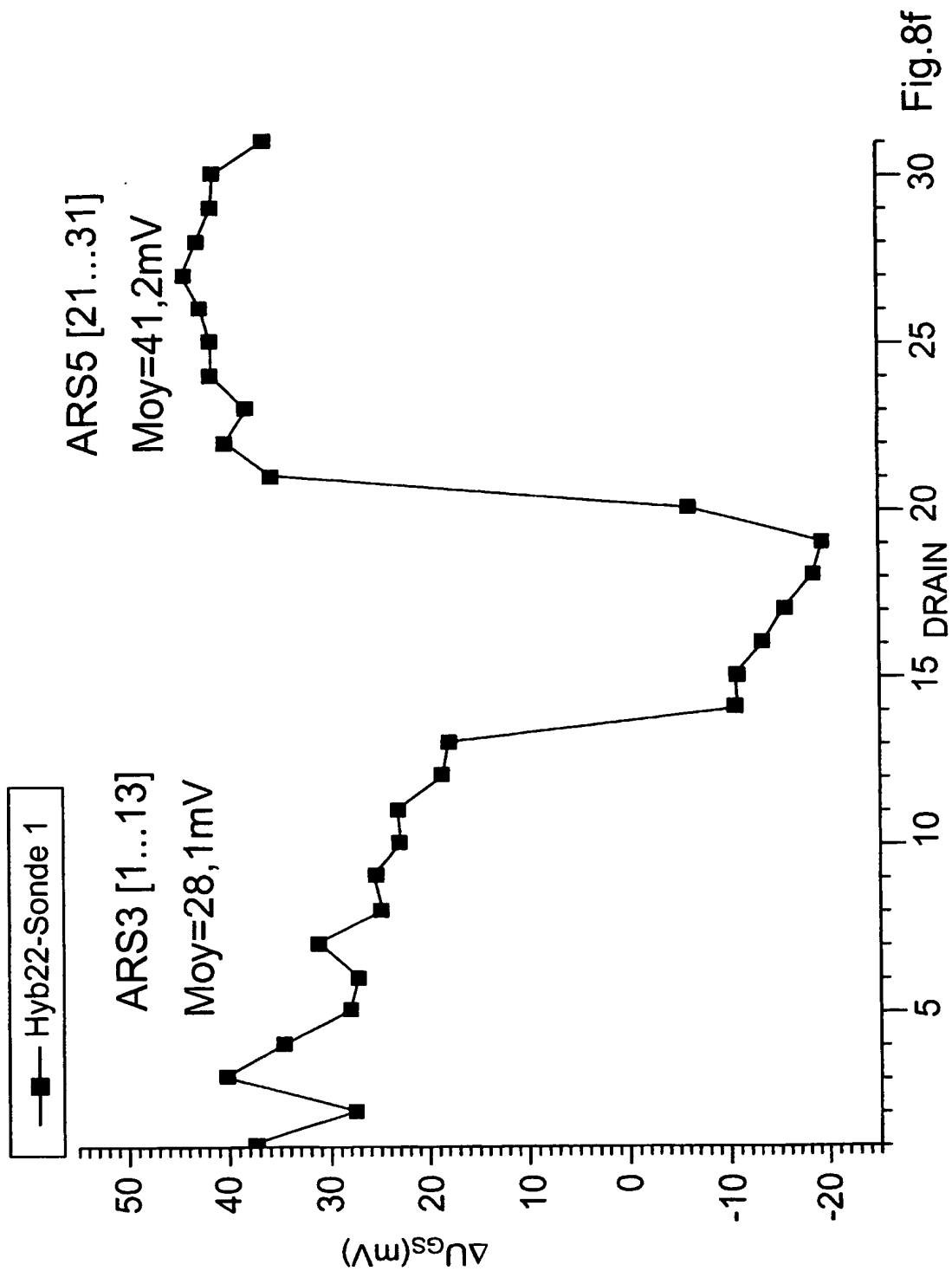


Fig.8d

13/20



14/20



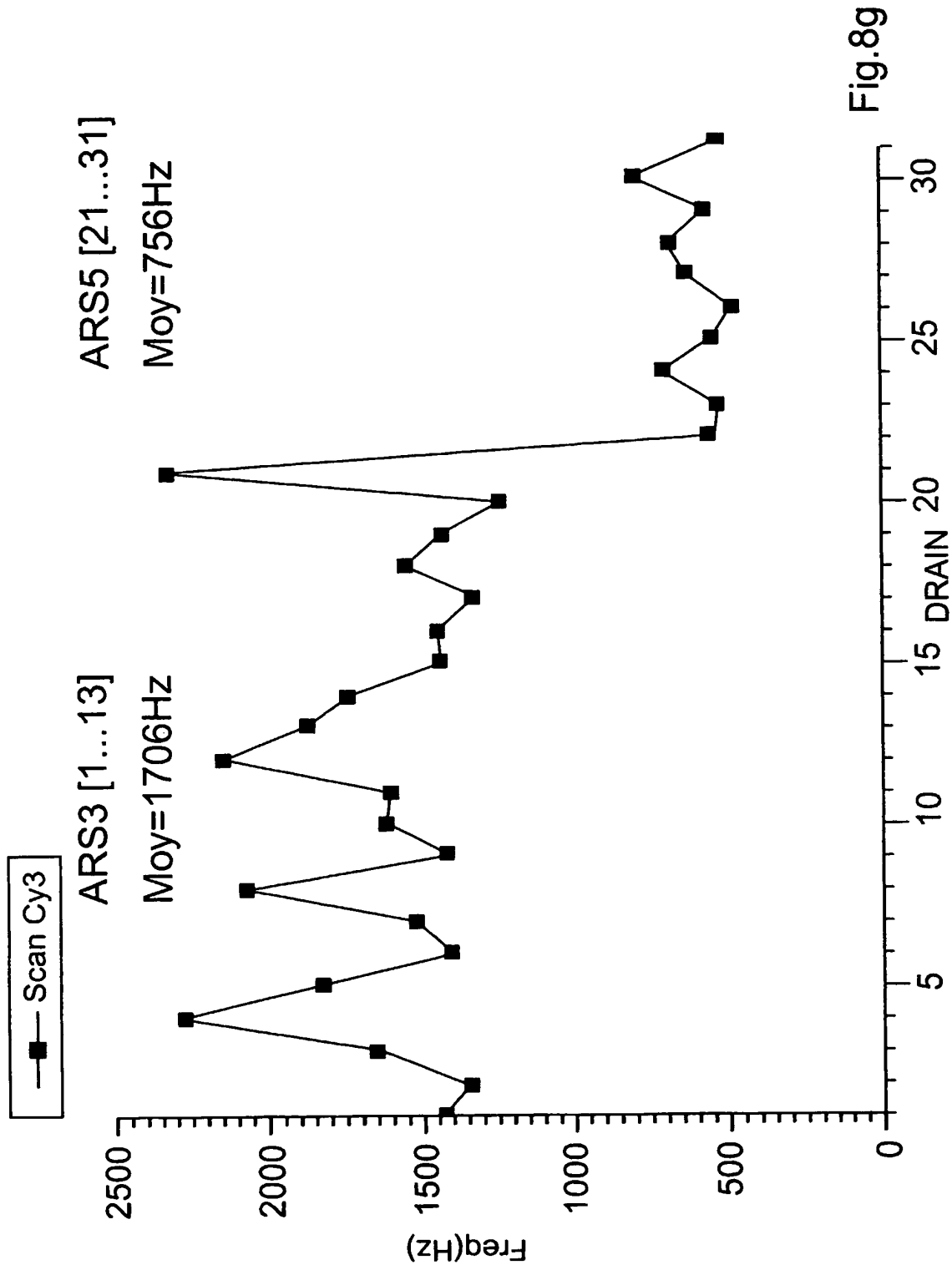


Fig.8g

16/20

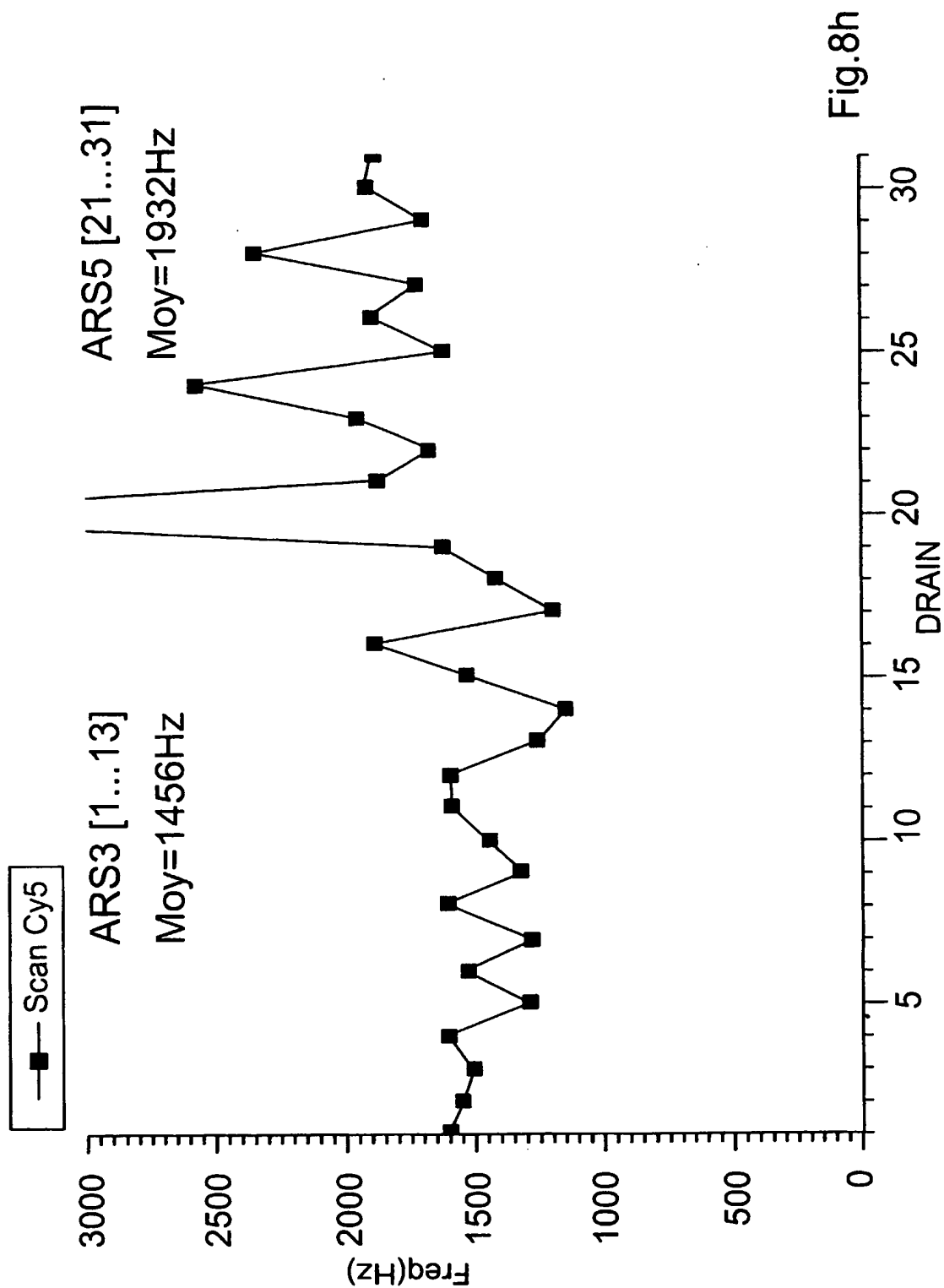


Fig.8h

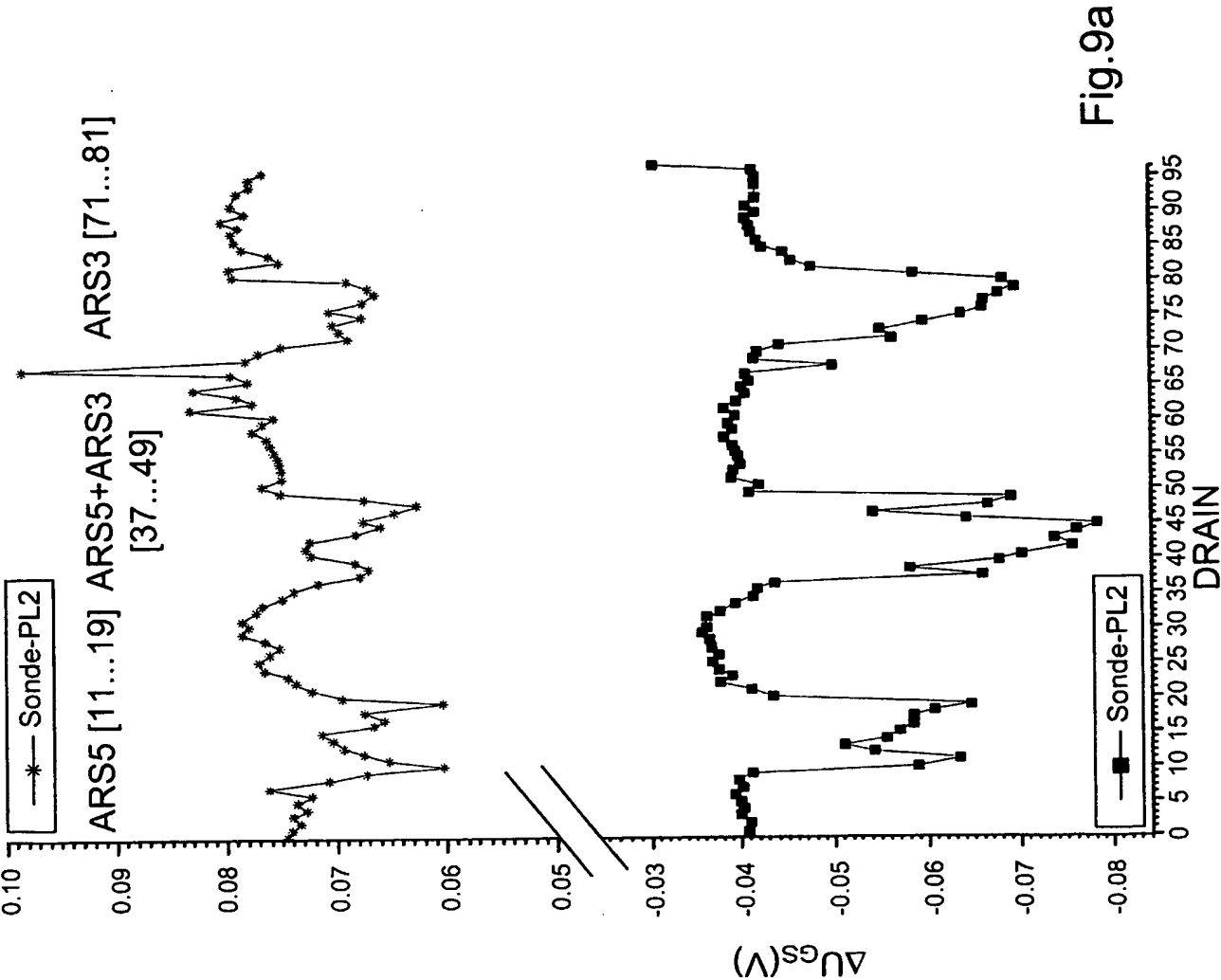


Fig.9a

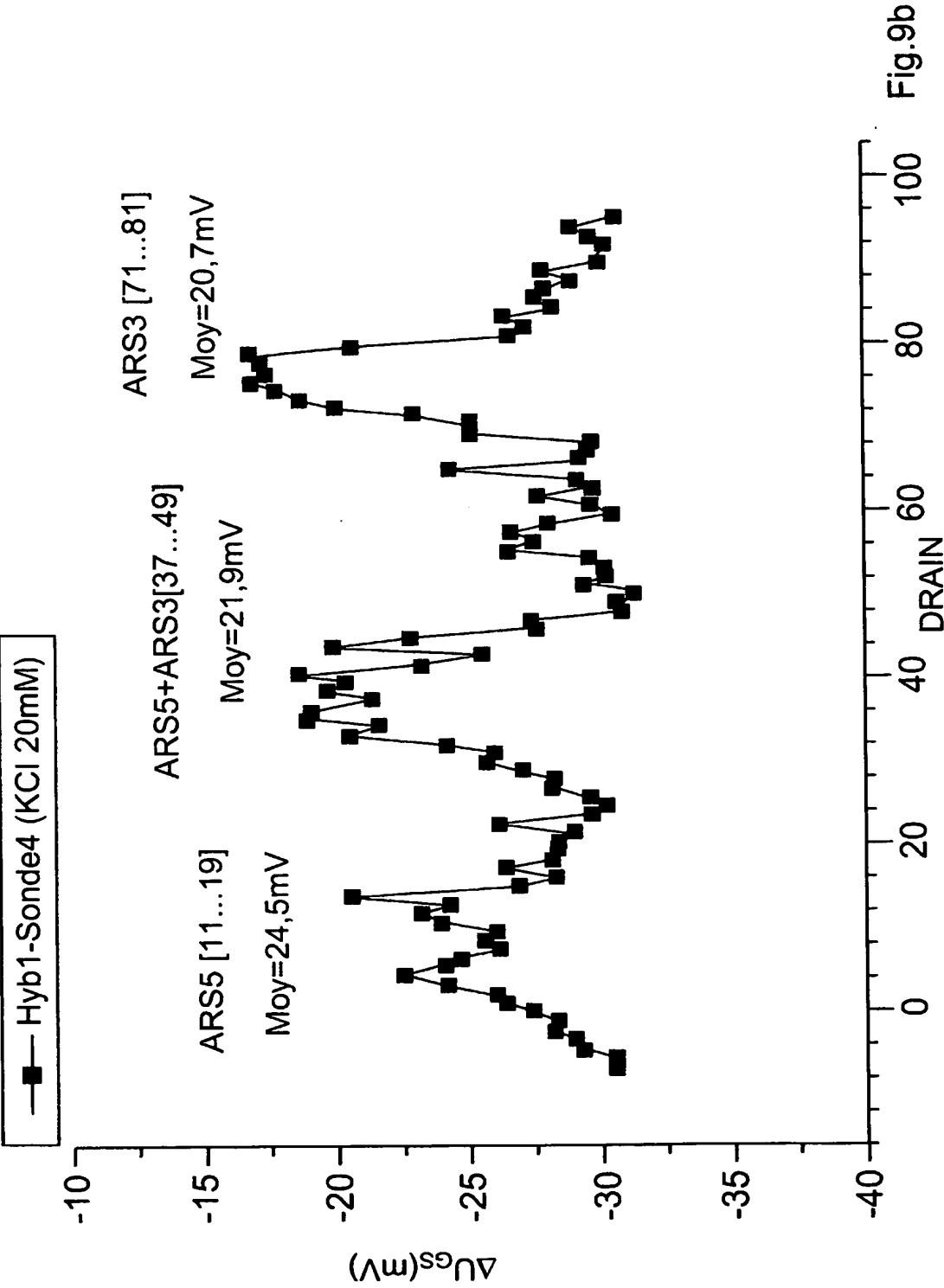
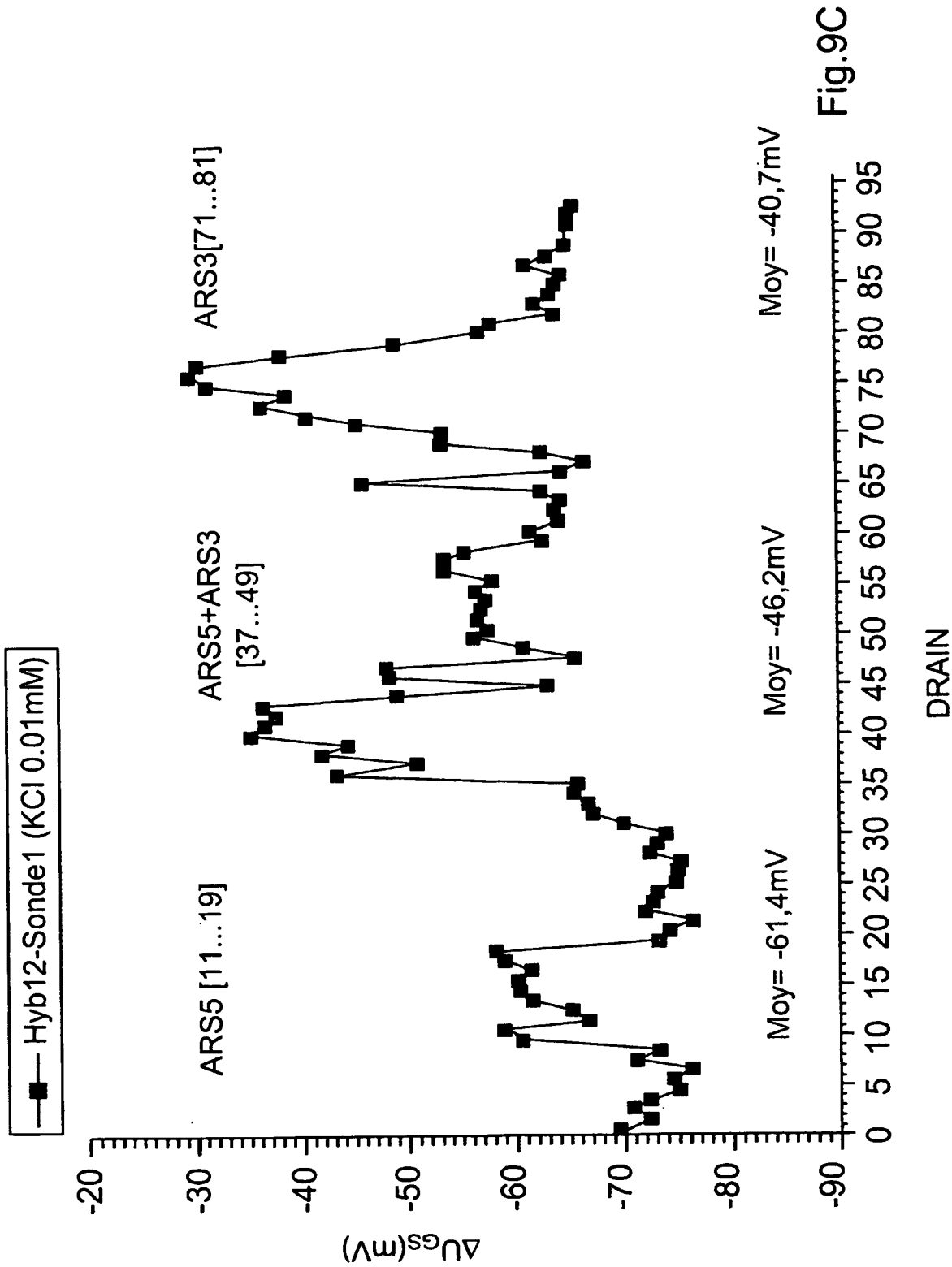
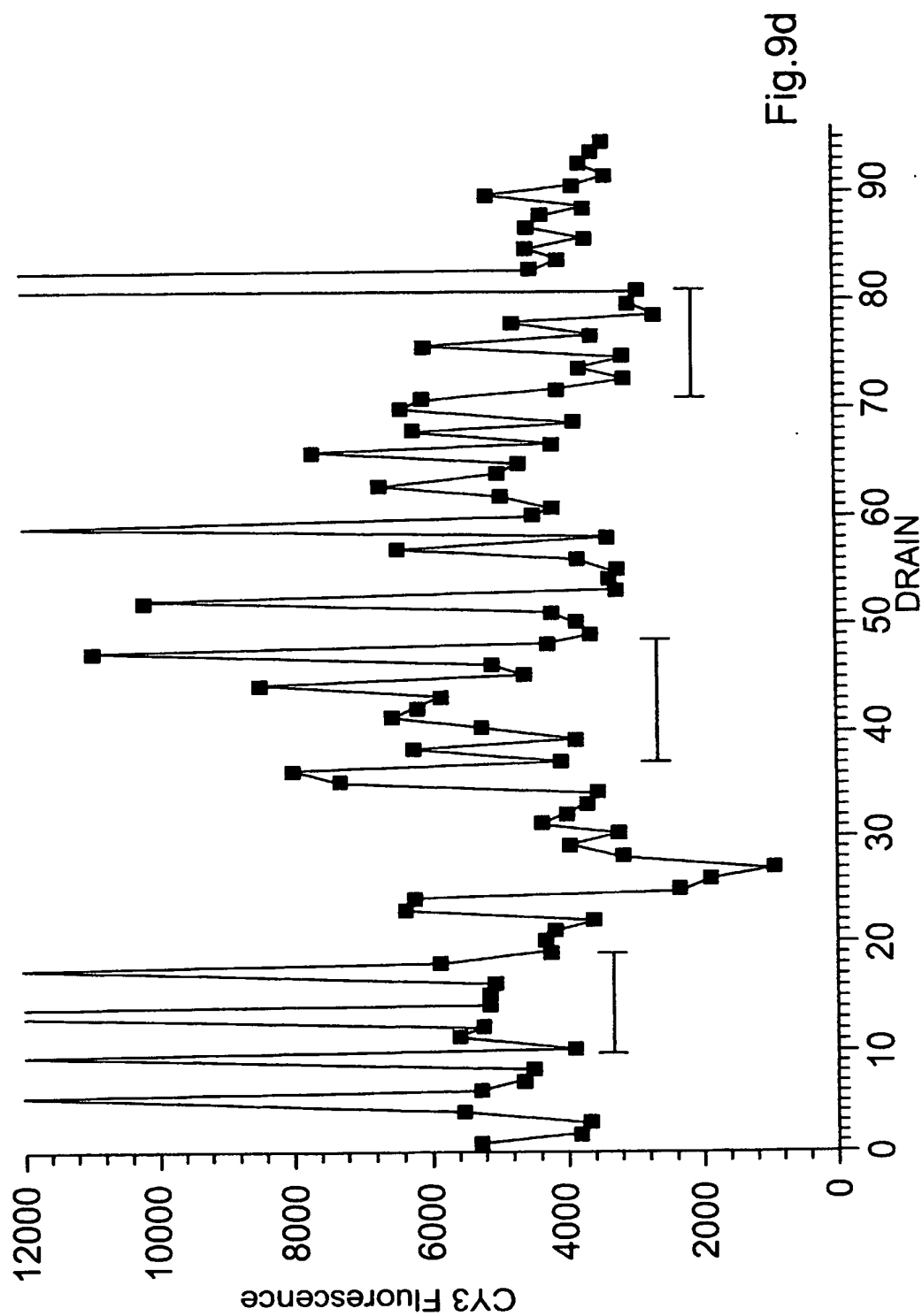


Fig.9b





20/20



**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 238 757 A (SCHENCK JOHN F) 9 December 1980 (1980-12-09) abstract; figures 1-3 column 3, line 15 -column 6, line 45 ---	1-4
Y	SOUTEYRAND E ET AL: "DIRECT DETECTION OF THE HYBRIDIZATION OF SYNTHETIC HOMO-OLIGOMER DNA SEQUENCES BY FIELD EFFECT" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY. B, MATERIALS, SURFACES, INTERFACES AND BIOPHYSICAL, WASHINGTON, DC, US, vol. 101, 1997, pages 2980-2985, XP001040796 ISSN: 1089-5647 the whole document abstract; figure 2 ----- -/--	5-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2003

Date of mailing of the international search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Leber, T

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TSURUTA H. ET AL.: "Detection of the products of apolymerase chain reaction by an ELISA system based on an ion sensitive field effect transistor" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 176, 1994, pages 45-52, XP009021947 abstract; figures 1,2 the whole document	5-21
P, Y	WO 03 054225 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH ; LEHMANN MIRKO (DE); MICRONAS GMBH (DE);) 3 July 2003 (2003-07-03) page 15, line 18 -page 16, line 16	1
P, Y	WO 03 052097 A (MIYAHARA YUJI ; HATTORI KUMIKO (JP); YASUDA KENJI (JP); HITACHI HIG) 26 June 2003 (2003-06-26) abstract; figures 1,5,16	1
A	WO 00 75276 A (CAHEN DAVID ; ARTZI REIT (IL); NAAMAN RON (IL); YEDA RES & DEV (IL)) 14 December 2000 (2000-12-14) page 2, line 24 -page 5, line 14	
A	M. NAKAMURA AND M. YANE: "Online pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> monitoring system using two-way cyclic pumping of lactate Ringer as a baseline solution" MEICAL & BIOLOGICAL ENGINEERING & COMPUTING, January 1987 (1987-01), pages 45-50, XP001156254 the whole document	
A	KIESSLING V ET AL: "EXTRACELLULAR RESISTANCE IN CELL ADHESION MEASURED WITH A TRANSISTOR PROBE" LANGMUIR, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 16, 2000, pages 3517-3521, XP001040795 ISSN: 0743-7463 the whole document	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/02091

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4238757	A	09-12-1980	NONE	
WO 03054225	A	03-07-2003	DE 10163599 A1 WO 03054225 A2	17-07-2003 03-07-2003
WO 03052097	A	26-06-2003	WO 03052097 A1	26-06-2003
WO 0075276	A	14-12-2000	AU 5099300 A WO 0075276 A2	28-12-2000 14-12-2000

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 238 757 A (SCHENCK JOHN F) 9 décembre 1980 (1980-12-09) abrégé; figures 1-3 colonne 3, ligne 15 -colonne 6, ligne 45 ---	1-4
Y	SOUTEYRAND E ET AL: "DIRECT DETECTION OF THE HYBRIDIZATION OF SYNTHETIC HOMO-OLIGOMER DNA SEQUENCES BY FIELD EFFECT" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY. B, MATERIALS, SURFACES, INTERFACES AND BIOPHYSICAL, WASHINGTON, DC, US, vol. 101, 1997, pages 2980-2985, XP001040796 ISSN: 1089-5647 le document en entier abrégé; figure 2 --- -/-	5-21

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 décembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/12/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Leber, T

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	TSURUTA H. ET AL.: "Detection of the products of apolymerase chain reaction by an ELISA system based on an ion sensitive field effect transistor" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 176, 1994, pages 45-52, XP009021947 abrégé; figures 1,2 le document en entier ----	5-21
P,Y	WO 03 054225 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH ;LEHMANN MIRKO (DE); MICRONAS GMBH (DE);) 3 juillet 2003 (2003-07-03) page 15, ligne 18 -page 16, ligne 16 ----	1
P,Y	WO 03 052097 A (MIYAHARA YUJI ;HATTORI KUMIKO (JP); YASUDA KENJI (JP); HITACHI HIG) 26 juin 2003 (2003-06-26) abrégé; figures 1,5,16 ----	1
A	WO 00 75276 A (CAHEN DAVID ;ARTZI REIT (IL); NAAMAN RON (IL); YEDA RES & DEV (IL)) 14 décembre 2000 (2000-12-14) page 2, ligne 24 -page 5, ligne 14 ----	
A	M. NAKAMURA AND M. YANE: "Online pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> monitoring system using two-way cyclic pumping of lactate Ringer as a baseline solution" MEICAL & BIOLOGICAL ENGINEERING & COMPUTING, janvier 1987 (1987-01), pages 45-50, XP001156254 le document en entier ----	
A	KIESSLING V ET AL: "EXTRACELLULAR RESISTANCE IN CELL ADHESION MEASURED WITH A TRANSISTOR PROBE" LANGMUIR, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 16, 2000, pages 3517-3521, XP001040795 ISSN: 0743-7463 le document en entier -----	

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4238757	A	09-12-1980	AUCUN	
WO 03054225	A	03-07-2003	DE 10163599 A1 WO 03054225 A2	17-07-2003 03-07-2003
WO 03052097	A	26-06-2003	WO 03052097 A1	26-06-2003
WO 0075276	A	14-12-2000	AU 5099300 A WO 0075276 A2	28-12-2000 14-12-2000